



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

MATERIALI ARGILLOSI IBRIDI CON POTENZIALE ATTIVITÀ BIOLOGICA

IL DOTTORE
Giuseppa Biddeci

IL COORDINATORE
Prof.ssa Patrizia Diana

IL TUTOR
Prof.ssa Serena Riela

CO TUTOR
Dott. Francesco Di Blasi

CICLO XXXIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2021

Indice

<i>Abstract</i>	6
<i>Introduzione</i>	8
Nanoscienza e Nanotecnologia	9
Nanomateriali	11
Proprietà dei nanomateriali e loro tossicità	13
Nanomateriali e “Drug delivery”	17
<i>Capitolo 1 Argille minerali</i>	23
1.1 Argille minerali-“Clay minerals”	24
1.2 Tossicità delle argille minerali	27
1.3 Uptake cellulare delle argille minerali	29
1.4 Argille minerali come carrier di farmaci	31
<i>Capitolo 2 Halloysite</i>	37
2.1 Halloysite	38
2.2 Caratteristiche dell’halloysite	39
2.3 Biocompatibilità dell’halloysite	46
2.4 HNT come carrier di farmaci	50
<i>Scopo della tesi</i>	62
<i>Risultati</i>	68
3.1 Sistema ibrido HNT/1	69
3.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT/1	70
3.3 Uptake dell’ibrido HNT/1	72
3.4 Emocompatibilità dell’ibrido HNT/1	82
4.1 Sistema ibrido HNT/KGN/Lap	85
4.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT/KGN	88
5.1 Sistema ibrido HNTs/CDs	92

5.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT-CDs	94
5.3 <i>Uptake</i> dell'ibrido HNT-CDs	95
5.4 Attività antiossidante dell'ibrido HNT-CDs	99
5.5 Interazione HNT-CDs / DNA	101
<i>Conclusioni</i>	103
<i>Materiali e Metodi</i>	107
6.1 Materiali	108
6.2 Modelli sperimentali <i>in vitro</i>	109
6.2.1 Cellule HeLa	109
6.2.2 Cellule Raw 264.7	110
6.2.3 Cellule Hep-G2	111
6.2.4 Cellule MC3T3-E1	111
6.3 Sistema ibrido HNT/1	113
6.3.1 Sintesi HNT/1	113
6.3.2 Cinetica di rilascio	113
6.3.3 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa e Raw 264.7 dopo trattamento con HNT/1	113
6.3.4 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa e Raw 264.7 dopo trattamento con Cytochalasin D, Nocodazole, Chlorpromazine hydrochloride e Sodium azide	115
6.3.5 Inibizione dei pathways di internalizzazione	117
6.3.6 Microscopia a fluorescenza	117
6.3.7 Test di emocompatibilità	118
6.4 Sistema ibrido HNT/KGN/Lap	120
6.4.1 Caricamento della Kartogenina (KGN) sui nanotubi	120
6.4.2 Preparazione dei gels	120
6.4.3 Estrazione del liquido sinoviale	120
6.4.5 Rilascio di KGN dal gel	121

6.4.6 Calcolo della concentrazione di KGN rilasciata	121
6.4.7 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule Hep-G2 e MC3T3-E1 dopo trattamento con HNT/KGN	122
6.5 Sistema ibrido HNT-CDs	124
6.5.1 Sintesi HNT-NH ₂	124
6.5.2 Sintesi composto 1	124
6.5.3 Sintesi CDs	124
6.5.4 Sintesi HNT-CDs	125
6.5.5 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa per testare la citocompatibilità di HNT-CDs	126
6.5.6 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa per testare le capacità antiossidanti di HNT-CDs	127
6.5.7 Microscopia a fluorescenza per valutare le proprietà fotoluminescenti dei CDs e l'internalizzazione del composito HNT-CDs	128
6.5.8 Analisi citofluorimetrica	129
<i>Bibliografia</i>	130

Abstract

Halloysite is a natural clay mineral, member of the Kaolin group, with characteristic tubular morphology, usually named halloysite nanotubes (HNTs). The different surface chemistry of halloysite allows the selective modification both of external surface and of inner lumen by supramolecular or covalent interactions. An interesting aspect of HNTs is related to the possibility of introduce different species that can be released more slowly compared to the pristine compound. The aim of this work was to study the biological properties of new HNT-organic hybrids able to load and release suitable organic molecules with the future goal of using them as drug carrier and delivery systems. The cytocompatibility of some new hybrid nanomaterials has been evaluated on different cell lines, demonstrating that these are highly biocompatible. The functionalization of HNTs, by supramolecular interactions in the lumen or by covalent bonding on the outer surface, allowed us to give them photo-luminescent and antioxidant properties. Cellular mechanisms involved in the internalization of HNTs have been investigated through *in vitro* inhibition tests, demonstrating that internalization is an energy-dependent process. In addition, flow cytometry analysis showed that unlike pristine nanotubes, they could enter the cell after only 30 minutes. Fluorescence microscopy has also shown that after cellular uptake the nanocomposites are located both in the perinuclear region and in the nuclei, suggesting that they could be a good drug carrier system with potential use in gene delivery.

Introduzione

Nanoscienza e Nanotecnologia

Il concetto di nanoscienza trova le sue origini nel V secolo a.C., quando al tempo dei Greci e di Democrito gli scienziati cominciarono a prendere in considerazione l'idea di materia intesa come qualcosa di infinitamente divisibile in parti più piccole, quelli che oggi chiamiamo atomi. Per parlare di nanoscienza e nanotecnologie come le intendiamo oggi è necessario arrivare fino al 1959, anno in cui il fisico Richard Feynman formulò per la prima volta il concetto di nanoscienza durante il suo discorso intitolato "There's plenty of room at the bottom-An invitation to enter a new field of physics", in cui si prendeva in considerazione la possibilità di costruire macchine a livello molecolare e di creare sistemi per l'immagazzinamento di ingenti quantità di informazioni in spazi molto limitati (Feynman R., 1960). Era il 1986 quando Eric Drexler nel suo libro "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology" descrisse in questo modo la nanotecnologia: *«[...] una tecnologia a livello molecolare che ci potrà permettere di porre ogni atomo dove vogliamo che esso stia. Chiamiamo questa capacità "nanotecnologia", perché funziona sulla scala del nanometro, 1 milionesimo di metro.»* (Drexler E., 1986). Anche se i termini nanoscienza e nanotecnologia sono spesso associati e strettamente correlati tra loro, è corretto fare una distinzione. La prima racchiude tutte quelle discipline che studiano il comportamento della materia su scala nanometrica, quali per esempio la chimica supramolecolare e la biologia molecolare (Bayda S. *et al.*, 2020). La nanotecnologia invece è la capacità di costruire materiali, dispositivi e sistemi con precisione atomica (Goddard III W. *et al.*, 2012). Questa, grazie alla capacità di convertire la teoria della nanoscienza in applicazioni utili per la creazione di strutture con forma e dimensioni su scala nanometrica, è una delle tecnologie più promettenti del XXI secolo (Allhoff F., 2007; Bayda S. *et al.*, 2020). Attualmente le nanotecnologie si prestano per applicazioni in tutti i settori produttivi, tra cui quello biomedico (nanotecnologia molecolare, biosensori nanotecnologici applicati alla diagnostica, somministrazione di farmaci etc.). Uno degli aspetti più importanti legato al

loro sviluppo è lo studio dei processi biologici che avvengono su scala nanometrica, essendo le cellule sistemi nanostrutturati (Whitesides G., 2003). Considerando che queste in media hanno un diametro di circa $10\ \mu\text{m}$ e che le componenti cellulari hanno dimensioni nell'ordine dei sub-micron (Figura 1), è facile intuire come ogni cellula possa accogliere al suo interno numerose nano-particelle. La nanomedicina, quindi, si occupa dello studio delle funzioni biologiche che avvengono a livello cellulare, con l'obiettivo di sviluppare nano-particelle e nuovi materiali nanostrutturati in grado di veicolare farmaci o altre sostanze all'interno dell'organismo in modo mirato (Gnach A. *et al.*, 2015).

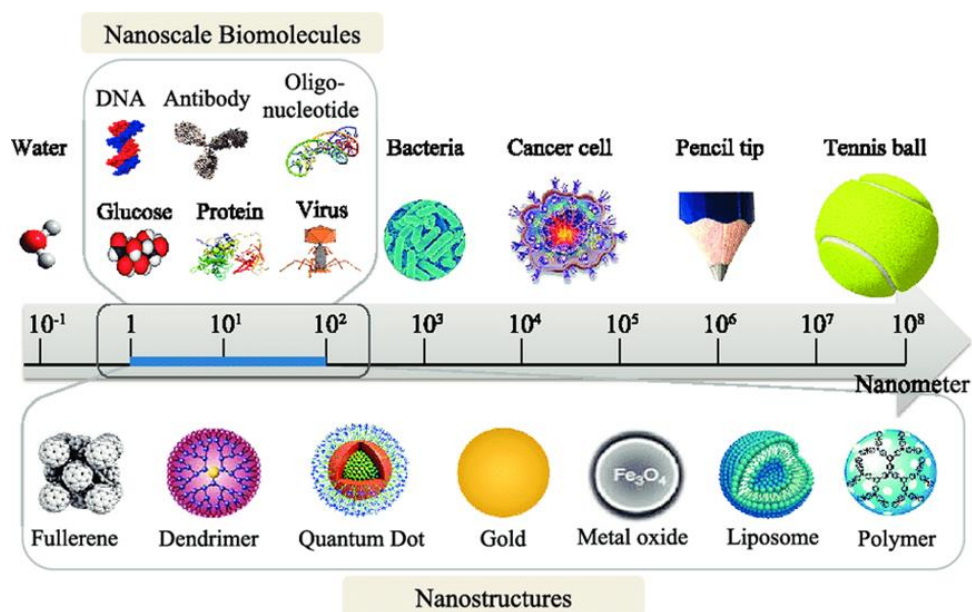


Figura 1. Scala delle dimensioni di alcune strutture biologiche e di alcuni materiali nanostrutturati utilizzati per lo sviluppo di sistemi di *drug carrier* (Saallah S. *et al.*, 2018).

Nanomateriali

Con il termine nanomateriali (NMs), secondo la Raccomandazione della Commissione Europea 2011/696/UE del 20.10.2011 si intende: «*un materiale naturale, derivato o fabbricato contenente particelle, in stato libero o sotto forma di aggregato o di agglomerato e nel quale, almeno il 50% della distribuzione dimensionale numerica di tali particelle possiede una o più dimensioni esterne nella classe di grandezza 1-100 nm*». Come materiali emergenti, i nanomateriali nel corso degli anni hanno attirato molta attenzione grazie alle loro ridotte dimensioni, ma grazie anche alle innumerevoli proprietà che li contraddistinguono. Infatti, le dimensioni nanometriche di un materiale fanno sì che questo assuma proprietà chimico-fisiche particolari e diverse rispetto ai materiali convenzionali (*bulk materials*). Queste proprietà sono determinate dalla composizione chimica, dalla struttura, dalla superficie, dall'aumento di reattività superficiale in rapporto al volume, dalla solubilità e dallo stato di aggregazione. Agendo sulla struttura della materia, con il variare delle dimensioni, si apprezzano modificazioni di alcune caratteristiche tra cui quelle chimiche, ottiche, biologiche, termodinamiche, spettroscopiche, elettroniche ed elettromagnetiche che conferiscono appunto proprietà del tutto nuove (Peer D. *et al.*, 2007; Xia Y. *et al.*, 2009; Nagavarma B. *et al.*, 2012) associate proprio con le dimensioni in scala nanometrica. Grazie a queste proprietà, è possibile intuire i potenziali vantaggi derivati dall'utilizzo dei nanomateriali come sistemi di *drug carrier* e *delivery*. Allo stato attuale esistono diverse tipologie di nanosistemi utilizzati in ambito biomedico (Figura 2), che in base alla loro composizione possono essere classificati principalmente in nanosistemi a base organica, inorganica, polimerica, lipidica o composita. Tra quelli di più comune utilizzo ci sono per esempio i liposomi, le micelle, i dendrimeri, i nanosistemi compositi con core metallico, le nanostrutture a base di carbonio e silicio, ecc., la cui applicazione come sistemi di *drug carrier* è stata ampiamente studiata nel corso degli anni (Fornaguera C. *et al.*, 2017). I liposomi, per esempio, sono ampiamente utilizzati nell'industria farmaceutica; questi

possono essere utilizzati per trasportare al loro interno sia molecole di natura idrofila che idrofobica, svolgendo attività di protezione preservandone le caratteristiche e veicolandole, con le opportune modifiche, direttamente al sito bersaglio (Atrooz O.M., 2011). Anche le micelle sono ampiamente utilizzate dal punto di vista biologico, grazie alle catene idrofobiche che si trovano all'interno e i gruppi idrofili all'esterno in contatto con il solvente, è possibile solubilizzare all'interno del core idrofobico sostanze altrimenti insolubili in fase acquosa. Sono quindi capaci di trasportare molecole non polari attraverso un mezzo acquoso o di veicolare farmaci, che in genere sono poco solubili in acqua. Questa capacità di trasporto può essere variata se si modificano i parametri che determinano la forma e la dimensione delle micelle (Gaucher G. *et al.*, 2005). Altri interessanti nanomateriali di uso più comune sono per esempio i nanotubi di carbonio (CNT), *quantum dots*, nanoparticelle d'oro (*gold nanoparticles*), ecc. (Liang R. *et al.*, 2014; Jeevanandam J. *et al.*, 2018).

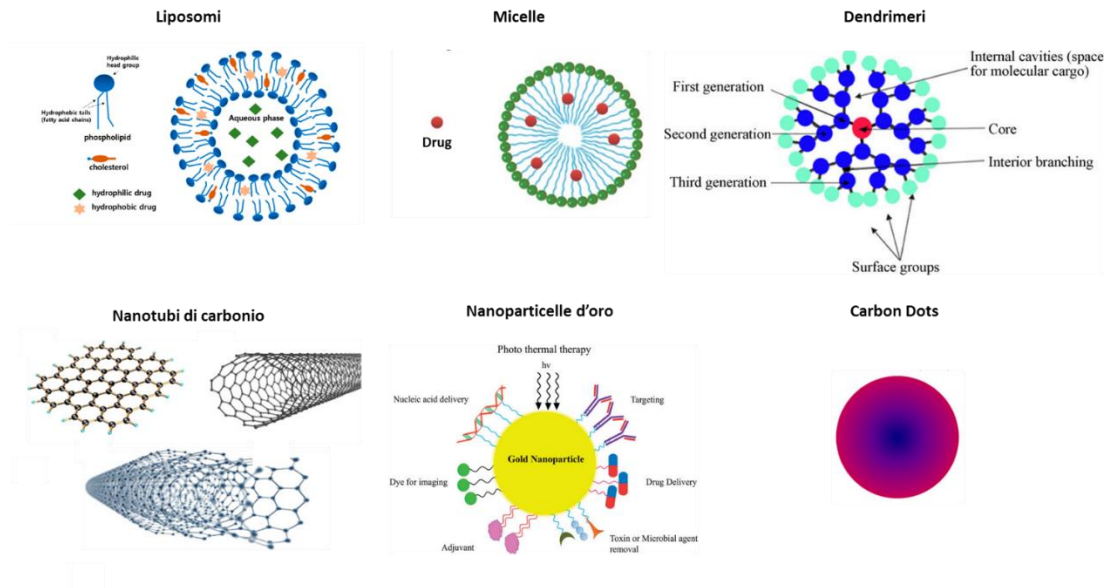


Figura 2. Alcune tipologie di nanomateriali utilizzati in ambito biomedico.

Proprietà dei nanomateriali e loro tossicità

Le proprietà che distinguono i nanomateriali, assenti a livello macroscopico, sono principalmente dovute alle loro dimensioni. Il rapporto superficie/volume è molto elevato e seguono leggi chimiche a metà tra la fisica classica e quella quantistica. Composizione, dimensione e superficie sono le caratteristiche che devono essere tenute sotto controllo e che bisogna considerare al fine di conferire le diverse proprietà ai nanomateriali. Poiché questi, unitamente alle nanotecnologie, stanno diventando sempre più parte integrante della quotidianità è importante valutare il loro impatto sull'ambiente e sugli organismi viventi. Infatti, di recente il loro potenziale effetto tossicologico sugli esseri umani, sugli animali e sull'ambiente ha riscontrato molto interesse, mettendo in risalto che le particolari proprietà dei nanomateriali possono indurre effetti tossici (Maynard A.D. *et al.*, 2006; Nel A. *et al.*, 2006; Singh N., 2009). L'impatto negativo sulla salute umana è uno dei problemi più significativi e la sempre più crescente esposizione a diverse tipologie di nanomateriali rende indispensabile determinare un loro possibile effetto tossico; a tale scopo risulta importante valutare e caratterizzare le proprietà chimico-fisiche, dimensioni, solubilità, composizione chimica, area superficiale, energia superficiale, ecc. (Gatoo M.A. *et al.*, 2014). Tra le proprietà precedentemente elencate, quelle che hanno dimostrato avere il ruolo più importante nell'interazione con i sistemi biologici e che determinano come questi risponderanno, sono le dimensioni e la superficie (Powers K.W. *et al.*, 2007). È stato visto infatti, che i diversi meccanismi deputati all'internalizzazione cellulare dipendono principalmente dalle dimensioni del materiale (Foroozandeh P. *et al.*, 2018) e che anche la tossicità può dipendere da tale aspetto. Questo, è dovuto al fatto che dalle dimensioni dei nanomateriali dipende la capacità di entrare all'interno dei sistemi biologici, di interagire con le funzioni cellulari modificando la struttura delle macromolecole e di interferire quindi con le funzioni biologiche (Zhang X.Q. *et al.*, 2012; Gehr P. *et al.*, 2018). Un aspetto molto importante da non sottovalutare, quando si ricorre all'impiego di terapie che si basano

sull'utilizzo di nanoparticelle, è la modalità attraverso cui queste possono entrare nell'organismo e soprattutto come avviene, da parte di quest'ultimo, la *clearance* di tali sostanze. Le modalità attraverso cui può avvenire l'internalizzazione sono principalmente le seguenti (Yah C.S. *et al.*, 2011) (Figura 3):

- Inalazione
- Assunzione per via orale
- Assorbimento cutaneo
- Iniezione diretta

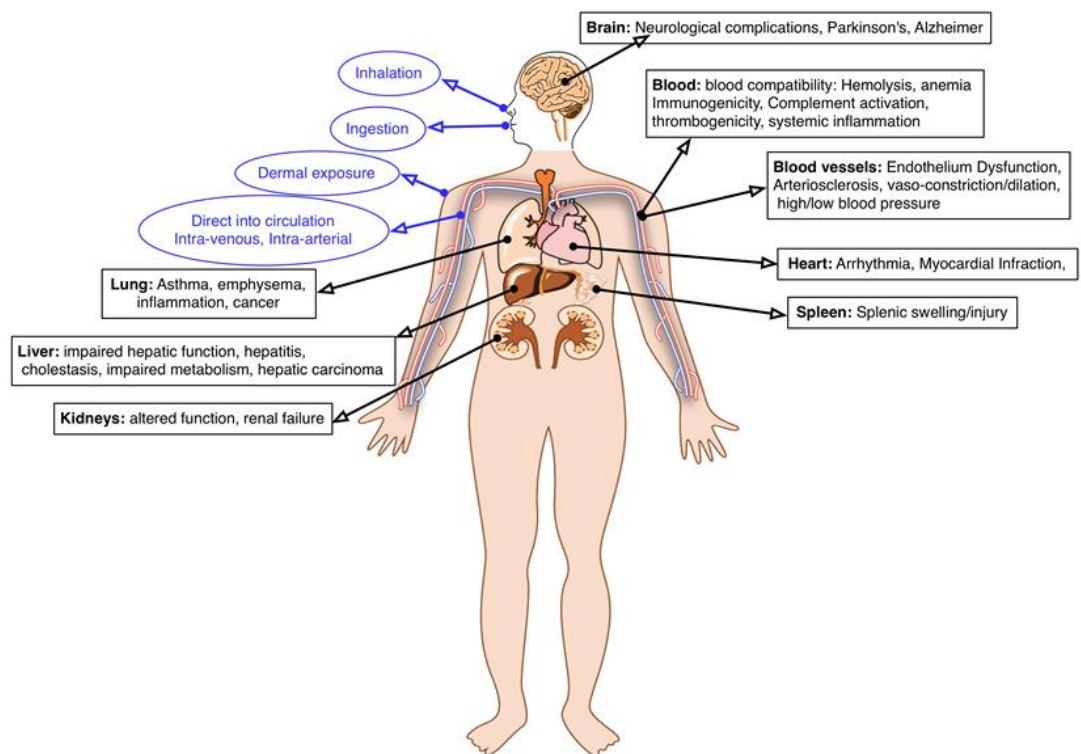


Figura 3. Tossicità sistemica dei nanomateriali.

Le nanostrutture una volta inalate, ingerite o somministrate per via topica possono giungere fino alla circolazione sanguigna ed essere trasportate ed accumulate a livello dei vari organi (De Jong W.H. *et al.*, 2008). Successivamente all'ingresso nella circolazione sistemica,

l'assorbimento da parte dei capillari sanguigni consente l'ulteriore distribuzione delle nanoparticelle nei vari distretti corporei. A seconda delle dimensioni e delle caratteristiche superficiali che queste presentano, possono essere riconosciute ed eventualmente degradate dai macrofagi (Rizvi S. *et al.*, 2018). Come introdotto precedentemente, ciò che influenza principalmente la tossicità delle nanoparticelle e la loro distribuzione a livello dell'organismo sono le dimensioni. È stato osservato infatti, che le nanoparticelle con dimensioni inferiori ai 5 nanometri vengono filtrate a livello renale, quando le dimensioni sono comprese tra i 100 e i 200 nanometri sfuggono alla filtrazione che avviene a livello epatico e della milza. Quelle le cui dimensioni superano i 200 nanometri invece si accumulano a livello di polmoni, fegato e milza. Si stima quindi che le dimensioni ottimali di un nanosistema da utilizzare in ambito biomedico siano intorno ai 100 nanometri (Blanco E. *et al.*, 2015). Oltre alle effettive dimensioni delle nanoparticelle, non bisogna sottovalutare la loro forma che ne influenza il percorso nel flusso sanguigno, la durata della circolazione, le interazioni con le membrane cellulari e la distribuzione ai vari organi (Liu Y. *et al.*, 2012). Anche la carica superficiale e l'eventuale modifica della loro superficie, possono avere effetti sulla stabilità delle nanoparticelle e sull'eventuale interazione per esempio con recettori cellulari (Guerrini L. *et al.*, 2018). È stato osservato anche che, una diminuzione delle dimensioni delle nanoparticelle è legata ad una maggiore capacità di danneggiare il DNA rispetto a particelle più grandi (Risom L. *et al.*, 2005) e che le dimensioni influenzano il comportamento dei nanomateriali anche dal punto di vista farmacologico. De Jong *et al.*, (2008) hanno messo in evidenza che le nanoparticelle con dimensioni inferiori a 50 nm, somministrate tramite iniezione endovenosa, si distribuiscono rapidamente a quasi tutti i tessuti con conseguente tossicità. Passando a dimensioni maggiori, comprese tra i 100 e 200 nm, è stato visto che le nanoparticelle vengono prontamente assorbite dal sistema reticoloendoteliale limitandone la tossicità. Da alcuni studi condotti *in vivo* è emerso che i nanomateriali una volta entrati nella circolazione sanguigna possono arrivare al sistema

nervoso centrale (Wang S. *et al.*, 2014), indurre reazioni infiammatorie a livello polmonare (Cullen R.T. *et al.*, 2000; Huang Y.C. *et al.*, 2005) ed essere causa di problemi a livello cardiocircolatorio (Kim J.Y. *et al.*, 2013). Inoltre possono anche accumularsi in vari organi come fegato, milza, linfonodi e midollo osseo (Singh S. *et al.*, 2007) (Figura 3). Relativamente al contesto cellula (Figura 4), gli effetti tossici indotti dal contatto con i nanomateriali possono essere di tipo chimico o fisico. Tra i meccanismi di tipo chimico possono essere inclusi la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Nel A.E. *et al.*, 2009), il perturbamento del trasporto di elettroni e ioni attraverso la membrana cellulare (Auffan M.I. *et al.*, 2008) e la perossidazione lipidica con conseguente diminuzione della fluidità delle membrane (Kamat J.P. *et al.*, 2000). Per quel che riguarda i meccanismi di tipo fisico, che dipendono dalla dimensione del nanomateriale e dalle proprietà superficiali (Walczyk D. *et al.*, 2010), questi includono rottura della membrana plasmatica e interruzione delle attività ad essa connesse come i processi di trasporto (Hussain S.M. *et al.*, 2005; Leroueil P.R. *et al.*, 2008) e *misfolding* delle proteine con conseguente perdita della loro funzione (Hauck T.S. *et al.*, 2008).

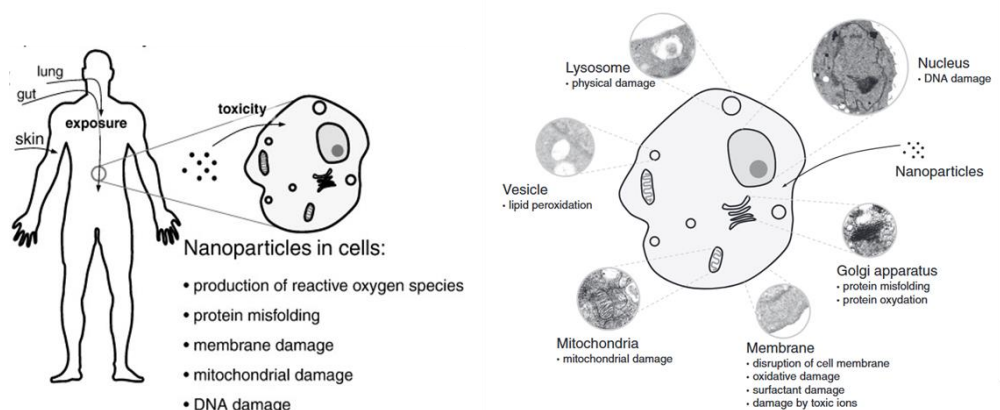


Figura 4. Tossicità dei nanomateriali relativamente al contesto “cellula” (Elsaesser A. *et al.*, 2012).

Riassumendo quindi, possiamo dire che il comportamento dei nanomateriali dal punto di vista biologico è dovuto principalmente alle loro dimensioni ridotte, che ne determinano alcune delle loro proprietà tra le quali la capacità di superare le barriere biologiche, le membrane cellulari, e l'elevata reattività chimica dovuta all'incremento della superficie per unità di massa (Elsaesser A. *et al.*, 2012).

Nanomateriali e “*Drug delivery*”

Con “*Drug Delivery Systems*” (DDS) si intendono quei sistemi alternativi di indirizzamento dei farmaci nell'organismo, aventi l'obiettivo di circoscriverne l'effetto biologico su una determinata tipologia di cellule, migliorando l'efficacia e riducendo la tossicità di una terapia (Saiz E. *et al.*, 2013). I sistemi di rilascio convenzionali rilasciano i farmaci molto velocemente in seguito alla somministrazione, con conseguente repentino aumento della concentrazione del farmaco a livello plasmatico e una brusca riduzione dopo un breve lasso di tempo. Questa oscillazione nelle concentrazioni può essere causa di tossicità con i conseguenti effetti collaterali ed essere responsabile di una scarsa efficacia del farmaco. Utilizzando un DDS si può migliorare la cinetica di rilascio e di conseguenza l'efficacia della terapia farmacologica. Infatti, in seguito alla somministrazione di un farmaco attraverso un DDS, la concentrazione plasmatica dello stesso aumenta e rimane costante nell'intervallo tra la massima e la minima concentrazione (Figura 5) (Robitzki A.A *et al.*, 2010; Shaik M.R *et al.*, 2012; Huynh C.T *et al.*, 2015). Negli ultimi anni l'emergere di nuove tecnologie per il *drug delivery* ha permesso di progettare molti sistemi innovativi che stanno progressivamente entrando a far parte della medicina moderna. Nonostante le loro promettenti prospettive, molto spesso i costi di produzione superano di gran lunga i costi del farmaco stesso. Per esempio il “Doxil”, ovvero la doxorubicina coniugata a liposomi, è un farmaco utilizzato per il trattamento del carcinoma ovarico, del sarcoma, e del mieloma. Negli Stati Uniti il costo è di circa 130 \$ per unità, che è 40-100 volte superiore al prezzo

della doxorubicina libera (Vikulina A. *et al.*, 2020). Nel corso degli anni quindi la ricerca ha continuato a fare progressi cercando anche fonti alternative per creare nuovi sistemi di *drug delivery* e migliorarne l'efficacia.

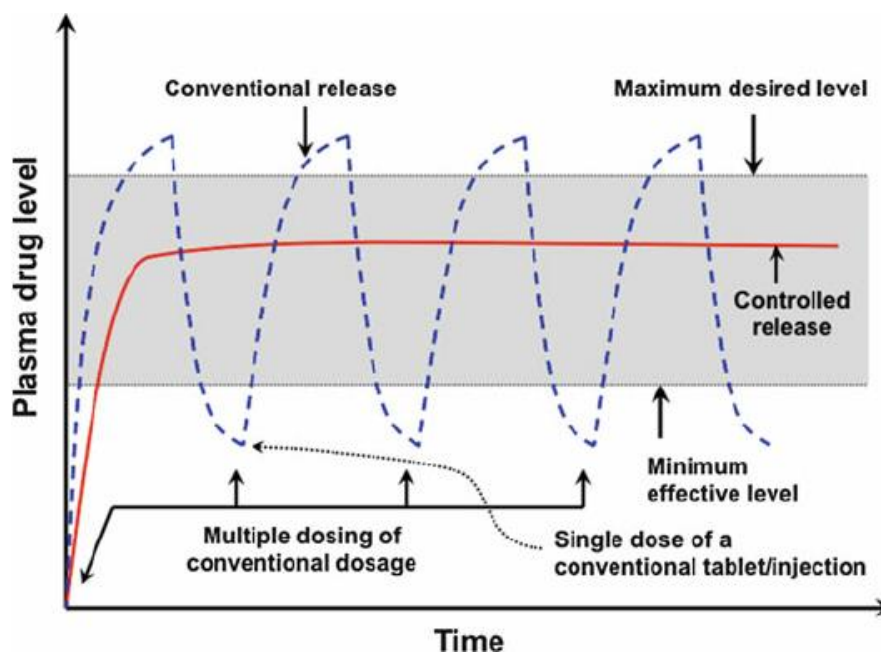


Figura 5. Correlazione delle concentrazioni plasmatiche di farmaco rilevate in seguito a somministrazione con capsule o compresse (linea blu tratteggiata) o tramite sistemi di rilascio controllato DDS (linea rossa) (Huynh C.T. *et al.*, 2015).

Nel periodo compreso tra il 1950 e il 1980 venne sviluppata la prima generazione di DDS, dedicata allo sviluppo di sistemi a rilascio sostenuto per via orale e transdermica. Tra il 1980 e il 2010 ha avuto luogo lo sviluppo della seconda generazione di DDS, il cui focus era incentrato sulla “*green nanotechnology*”, in riferimento all'utilizzo della nanotecnologia per migliorare la sostenibilità ambientale. A partire dal 2010 si parla di terza generazione di DDS, il cui obiettivo è quello di ridurre la tossicità, superare alcune problematiche legate alla scarsa solubilità dei nanomateriali in mezzo acquoso, ottenere un rilascio del farmaco modulato nel tempo e in determinati siti bersaglio (Park K., 2014). Nonostante i numerosi progressi raggiunti nel corso degli anni, la progettazione di nuovi sistemi di *drug delivery* rimane comunque una sfida per gli elevati costi di produzione, per la capacità di caricamento

del nanomateriale preparato, e non solo. Infatti, ultimamente la ricerca sta focalizzando l'attenzione sull'utilizzo di risorse naturali e rinnovabili, per la sostituzione di quelle di origine sintetica (Ruiz-Hitzky E. *et al.*, 2010; Ariga K. *et al.*, 2012). Tra i nuovi sistemi di origine naturale per veicolare i farmaci, ci sono le argille, i carbonati di calcio e le nanocellulose. Tutti questi materiali, oltre ad essere ampiamente disponibili in natura e ad avere un basso costo, possiedono inoltre una buona biocompatibilità e biodegradabilità e possono essere utilizzati per incapsulare e trasportare diversi farmaci o macromolecole sia di natura idrofila che lipofila. L'utilizzo della nanotecnologia in ambito biologico e medico, offre quindi la possibilità di valutare l'utilizzo di molte molecole, sia di origine naturale che sintetica, che non potrebbero essere somministrate in quanto tali a causa della loro scarsa funzionalità. Da qui nasce la nano-biotecnologia, definita come la combinazione tra biologia molecolare ed ingegneria. Questa si presta all'applicazione in campo medico, progettando una serie potenzialmente infinita di nanosistemi, che possono essere utilizzati per trasportare agenti terapeutici o diagnostici attraverso le barriere biologiche, per favorire l'accesso alle molecole, per mediare le interazioni molecolari e rilevare con alta sensibilità i cambiamenti molecolari. Attualmente l'obiettivo principale è quello di sviluppare nuovi nanosistemi che possano permettere di superare quei limiti che sono collegati alla somministrazione dei farmaci in maniera tradizionale, con una particolare attenzione rivolta ai trattamenti antitumorali. Infatti, una delle problematiche attualmente legata ai trattamenti chemioterapici è l'impossibilità di somministrare il farmaco direttamente al sito di interesse, con tutte le conseguenze che ne derivano (diffusione generalizzata del farmaco anche a cellule non tumorali, resistenza del tumore al farmaco ecc.) (Gao Z. *et al.*, 2012; Blanco E. *et al.*, 2015). Rispetto alla somministrazione diretta di chemioterapico libero, l'utilizzo dei sistemi per l'incapsulamento e il trasporto del farmaco ne impedisce la degradazione, portando quindi ad un miglioramento delle proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche con conseguente riduzione degli effetti collaterali (Onoue S. *et al.*, 2014). La nanotecnologia

moderna si propone di riuscire a controllare il decorso di una patologia attraverso la terapia combinata, con nuovi sistemi di diagnosi e di *imaging* applicati alla pratica clinica (Figura 6) (Avitabile E. *et al.*, 2018).

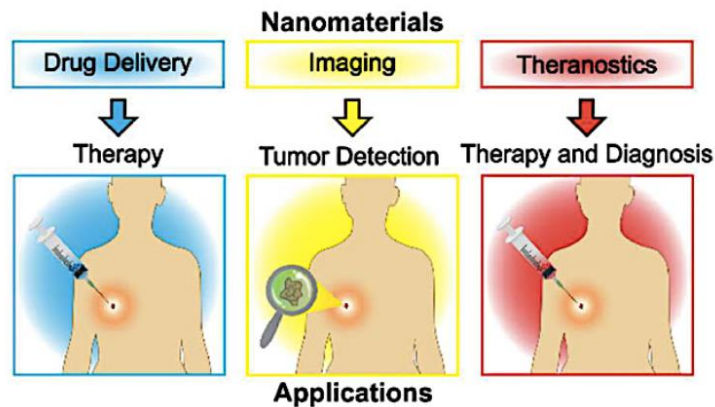


Figura 6. Possibili applicazioni delle nanotecnologie alla pratica clinica (Robitzki A.A. *et al.*, 2010).

In riferimento alle patologie tumorali, grazie a quello che viene denominato effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), l'utilizzo dei nanomateriali opportunamente funzionalizzati potrebbe assicurare risultati promettenti nei trattamenti chemioterapici, attraversando le pareti dei vasi sanguigni e arrivando direttamente alla massa cancerosa (Figura 7). Le dimensioni nanometriche associate alla compromissione dei tessuti neoplastici, in riferimento alla vascolarizzazione e al drenaggio linfatico con maggiore permeabilità e ritenzione, permettono un maggiore accumulo delle nanoparticelle nei tessuti tumorali rispetto che in quelli sani (Bazak R. *et al.*, 2014).

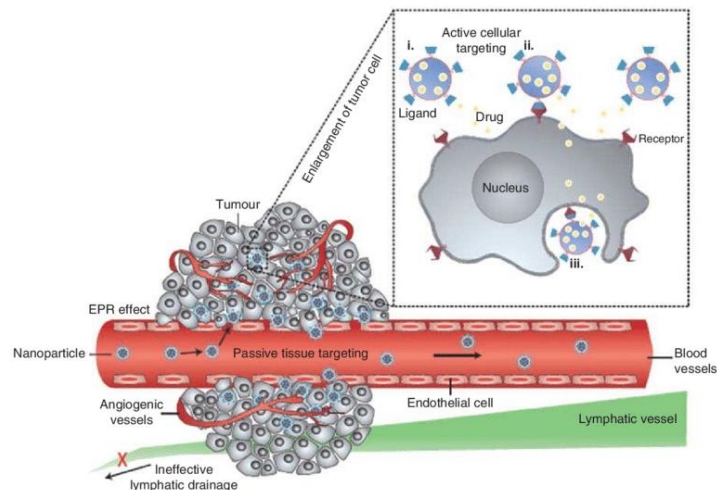


Figura 7. Accumulo di nanoparticelle nei tessuti tumorali tramite l'effetto EPR (Ganoth A. *et al.*, 2014).

Inoltre, si potrebbero sviluppare dei nanosistemi per il carico e il rilascio di agenti terapeutici che siano sensibili al microambiente tumorale (TME *Tumor Micro Environment*), ovvero l'ambiente cellulare ed extracellulare attorno al quale si sviluppa il tumore (Uthaman S. *et al.*, 2018), caratterizzato da una diminuzione dei valori di pH (Kato Y. *et al.*, 2013), dall'elevata presenza di specie reattive dell'ossigeno (Weinberg F. *et al.*, 2019), da un ambiente riducente (Cook J.A. *et al.*, 2004) e da ipossia (Petrova V. *et al.*, 2018) (Figura 8).

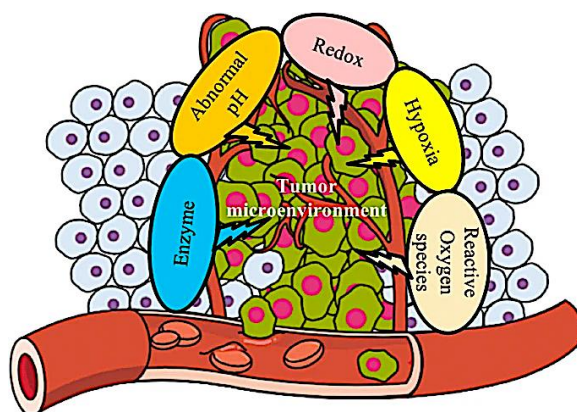


Figura 8 Rappresentazione grafica delle caratteristiche tipiche del microambiente tumorale (Uthaman S. *et al.*, 2018).

Riassumendo, i vantaggi teorici derivati dall'utilizzo di sistemi nanostrutturati in ambito medico potrebbero essere:

- Possibilità di modificare la cinetica del farmaco e incrementarne la solubilità.
- Incrementare il tempo di permanenza del farmaco all'interno dell'organismo.
- Veicolare il farmaco fino al sito bersaglio.
- Incrementare l'indice terapeutico del farmaco.
- Ridurre la possibilità di sviluppare farmacoresistenza.

Quindi, ciò che ci si propone è di impiegare questi sistemi in nuove strategie per il superamento dei problemi legati alle terapie tradizionali (Pietroiusti A. *et al.*, 2013).

Capitolo 1
Argille minerali

1.1 Argille minerali “*Clay minerals*”

L'associazione della “*Green Nanotechnology*”, al concetto di *drug delivery* ha portato allo sviluppo di quella che viene chiamata “*green nanomedicine*” sviluppata con nanomateriali bio ed ecocompatibili (Kanwar R. et al., 2019). Tra questi, le argille minerali si prestano ad essere i candidati perfetti per lo sviluppo di queste nuove tecnologie. La loro origine in natura è dovuta agli agenti atmosferici, idrotermali e ai processi diagenetici. L'interazione degli agenti atmosferici con le rocce porta alla formazione di silice, alluminio e altri materiali rocciosi che vengono chiamati minerali primari, questi poi in seguito ad un processo di ricristallizzazione possono dare origine a minerali secondari. L'argilla è una materia prima abbondante che ha una straordinaria varietà di usi e proprietà che dipendono in gran parte dalla struttura minerale e dalla composizione. Oltre alla struttura e alla composizione dell'argilla, ci sono molti altri fattori importanti che bisogna tenere in considerazione per determinarne le proprietà e le possibili applicazioni. Tra questi, vanno considerati la composizione dei minerali non argillosi, la presenza di materiale organico, la consistenza, il tipo e la quantità di ioni scambiabili e sali solubili (Grim R.E., 1950). In primo luogo, quando si parla di argille e argille minerali è opportuno definire bene i termini. Un'argilla minerale è un materiale a grana fine, naturale, terrosa (Grim R.E., 1962). Con il termine argilla invece, ci si riferisce ad un materiale naturale con particelle di dimensioni molto fini, con proprietà plastiche e frammenti di minerali o particelle composte principalmente da strati idratati di silicati di alluminio. In linea generale è possibile classificare le argille minerali in base alla morfologia e in base alla loro struttura chimica. Nella maggior parte dei casi sono caratterizzate da un aspetto lamellare o a scaglie e presentano sfaldature ben definite. La loro struttura atomica è costituita da due unità di base, ovvero fogli ottaedrici e tetraedrici. I fogli ottaedrici (Figura 9) sono composti da ossigeni e idrossili strettamente impacchettati in cui alluminio, atomi di ferro e magnesio sono disposti con coordinazione ottaedrica.

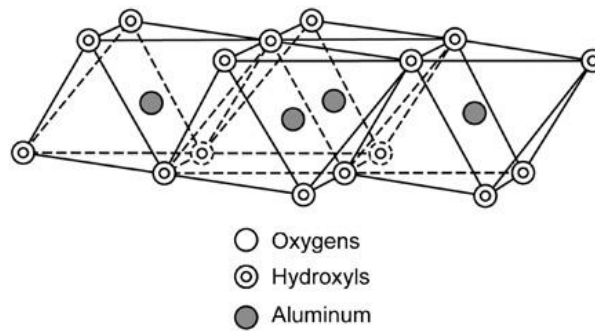


Figura 9. Rappresentazione grafica del foglio ottaedrico.

Nello strato tetraedrico di silice (Figura 10), l'atomo di silicio è equidistante da quattro ossigeni o idrossili disposti a formare un tetraedro con l'atomo di silicio al centro. Questi tetraedri sono disposti a formare una rete esagonale infinitamente ripetuta in due direzioni orizzontali per formare quello che viene chiamato appunto strato tetraedrico di silice.

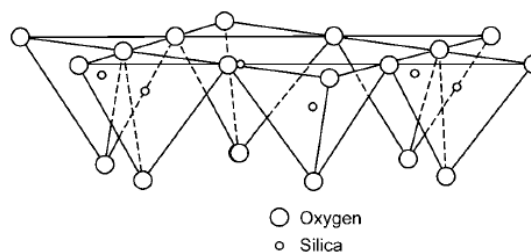


Figura 10. Rappresentazione grafica del foglio tetraedrico.

Gli strati ottaedrici e tetraedrici si uniscono condividendo gli ossigeni apicali o i gruppi idrossilici, per formare quello che viene chiamato strato minerale argilloso. L'arrangiamento e la differente composizione degli strati sono quelli che conferiscono le differenti proprietà fisico-chimiche e che permettono di distinguere, in base alla disposizione dei fogli tetraedrici e ottaedrici, fillosilicati del tipo 1:1, 2:1 e 2:1 (*Inverted ribbons*), secondo lo schema riportato in figura 11.

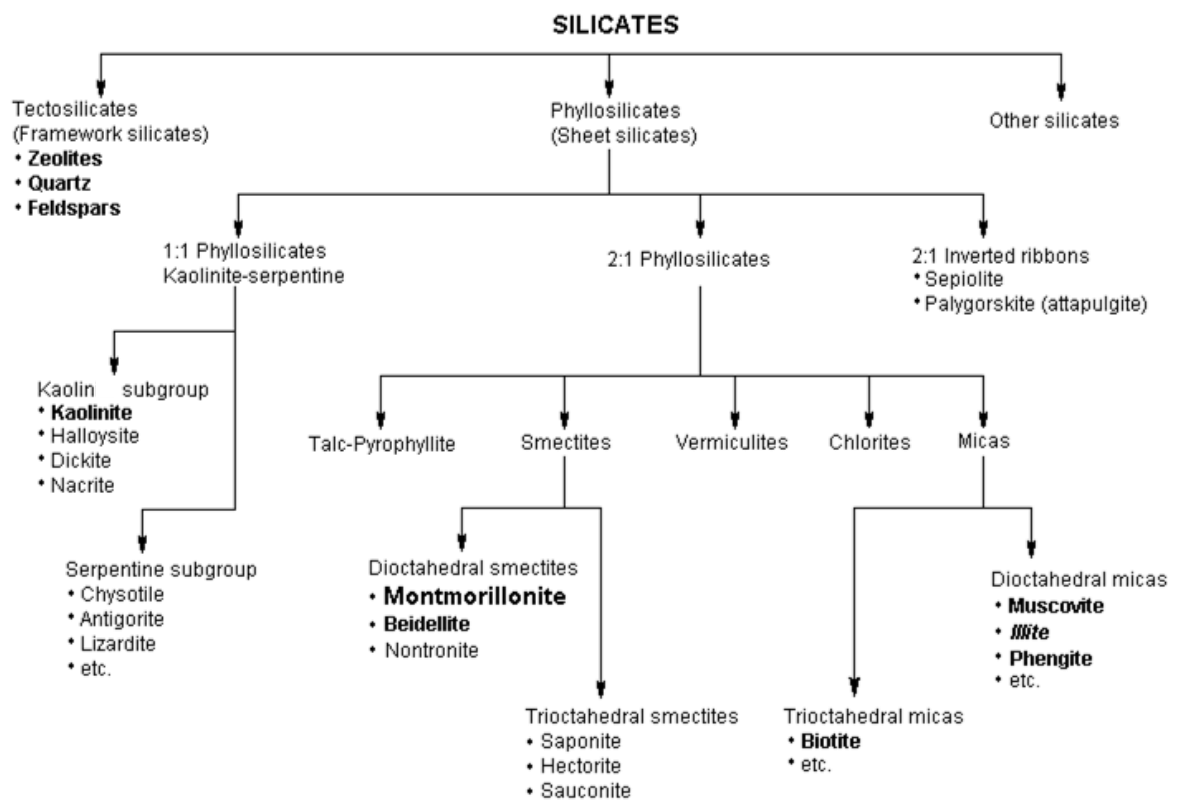


Figura 11. Classificazione delle argille minerali.

Il vasto utilizzo dei minerali argillosi è dovuto alle loro particolari proprietà, infatti tra i diversi tipi di minerali presenti in natura, quelli argillosi risultano essere i più promettenti per la loro applicazione in campo biomedico e a scopo terapeutico. Le prime testimonianze riguardanti l'utilizzo dell'argilla come agente antiinfiammatorio ed antisettico risalgono all'antico Egitto. Infatti, sin dai tempi più antichi le argille sono state utilizzate nella quotidianità per diverse applicazioni, basta pensare al periodo preistorico in cui trovavano impiego come antisettici, nel trattamento dei dolori e delle intossicazioni alimentari. Esistono diverse testimonianze riguardo il loro utilizzo da parte di *Homo erectus* e *Homo Neanderthalensis*, come antibatterici, nella cura della pelle, per cicatrizzare le ferite e per curare i morsi dei serpenti (Carretero M.I., 2002; Bergaya, F. *et al.*, 2006). È possibile affermare che, grazie alla loro abbondante presenza in natura, alle loro proprietà e alle

molteplici applicazioni per cui si prestano, le argille minerali sono considerate uno dei materiali emergenti del XXI secolo.

1.2 Tossicità delle argille minerali

Negli ultimi anni si è assistito ad un costante aumento della produzione di materiali che contengono nanoparticelle di argilla (*nanoclay*) ed inoltre, studi recenti hanno descritto il loro potenziale utilizzo come *carrier* di farmaci. Quindi risulta necessario valutare gli effetti tossicologici derivati dall'esposizione alle *nanoclay*. Sebbene vengano considerate sicure per l'uomo (Baek M. *et al.*, 2012), alcuni studi condotti *in vitro* hanno messo in evidenza la loro tossicità su diversi modelli sperimentali (Lordan S. *et al.*, 2011; Ibarguren C. *et al.*, 2014; Maisanaba S. *et al.*, 2014), indicando che la citotossicità indotta dalle nanoparticelle di argilla dipende da più fattori quali la concentrazione, il metodo sperimentale preso in considerazione e il tipo di argilla utilizzata (Brandelli A., 2018). Sono stati studiati gli effetti citotossici della Cloisite Na⁺ non modificata e dell'argilla organica Cloisite 93A in cellule di epatocarcinoma umane HepG2, ed è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare dopo 24 ore di esposizione alle argille. La formazione di ROS e danni alla membrana cellulare, sono stati osservati in seguito al trattamento con la Cloisite Na⁺ ma non con la Cloisite 93A. La stessa linea cellulare inoltre, è stata utilizzata per studiare la citotossicità dell'argilla modificata Cloisite 30B che oltre ad effetti genotossici, ha mostrato la capacità di indurre deterioramento della membrana mitocondriale, dilatazione delle endomembrane e la formazione di eterofagosomi (Maisanaba S. *et al.*, 2013). Uno studio simile, condotto su cellule Caco-2 (adenocarcinoma coloretale umano), ha messo in evidenza che soltanto la Cloisite 30B ha la capacità di indurre effetti citotossici. I risultati hanno mostrato una maggiore produzione di ROS, suggerendo che lo stress ossidativo fosse associato alla citotossicità, e ad alcune alterazioni dal punto di vista morfologico (Maisanaba S. *et al.*, 2014). Ahmed F. R. *et al.* (2015) hanno valutato gli effetti citotossici dell'halloysite

in vitro utilizzando come sistemi modello le linee cellulari HCT116 (carcinoma colon umano) ed HepG2, considerando che colon e fegato potrebbero essere tra gli organi sottoposti ad accumulo in seguito ad una somministrazione per via orale. I risultati nel complesso hanno dimostrato che l'halloysite non induce effetti citotossici alle concentrazioni in cui può essere utilizzata come eccipiente o ai dosaggi utilizzati per la somministrazione orale (Ahmed F. R. *et al.*, 2015). In generale, i principali meccanismi coinvolti nella citotossicità delle argille sembrano essere necrosi, apoptosi, stress ossidativo e genotossicità. Contrariamente, la maggior parte degli studi *in vivo* condotti sui roditori non ha rivelato chiare indicazioni di tossicità sistemica a dosi fino a 5 g/kg di peso corporeo (Maisanaba S. *et al.*, 2015a). In tabella 1, sono riportati alcuni degli studi svolti per la valutazione della tossicità delle *nanoclay*.

Nanoclay	Evaluation system	Major outcome	Reference
Montmorillonite, halloysite, kaolin, bentonite	<i>P. caudatum</i>	Very low or no toxicity	Kryuchkova M. <i>et al.</i> , 2016
Cloisite Na ⁺ and Cloisite 30B	Lung epithelial cells	Toxic effects with decrease in cell viability	Wagner A. <i>et al.</i> , 2017 a,b
Cloisite Na ⁺ and Cloisite 93A	HepG2 cells	Significant cell death	Lordan S. <i>et al.</i> , 2011
Nanoclay	Mice	Potential hepato and nephrotoxicity	Isoda K. <i>et al.</i> , 2017
Cloisite Na ⁺ and Cloisite 30B	HepG2 cells	Genotoxic effects and morphological alterations by Cloisite 30B	Maisanaba S. <i>et al.</i> , 2013
Cloisite Na ⁺ and Cloisite 30B	Caco-2 cells	Oxidative stress and morphological alterations by Cloisite 30B	Maisanaba S. <i>et al.</i> , 2014
Halloysite	HepG2 and HCT116 cells	General safe at practical doses	Ahmed F.R. <i>et al.</i> , 2015
Halloysite	<i>C. elegans</i>	Absence of toxic effects	Fakhrullin G.I. <i>et al.</i> , 2015

Tabella 1. Valutazione della tossicità indotta dalle nanoparticelle di argilla (Brandelli A., 2018).

Le nanoparticelle di argilla, una volta poste nel mezzo di coltura cellulare, possono aggregarsi in maniera differente e questo sembra avere un effetto sui loro meccanismi di tossicità (Lordan S. *et al.*, 2011). Allo stato attuale, gli effetti *in vivo* e le interazioni

farmacologiche con le *nanoclay* non sono stati ampiamente indagati e non risultano ancora del tutto chiari gli effetti che ne derivano sugli organismi. Sulla base degli studi disponibili, gli autori suggeriscono che le argille minerali mostrano un diverso profilo di tossicità e la valutazione dovrebbe quindi essere eseguita caso per caso (Maisanaba S. *et al.*, 2015a). Le principali domande sono legate alla loro reattività biologica, alla loro capacità di attraversare le barriere biologiche, al loro accumulo a livello degli organi bersaglio, al loro tempo di persistenza nell'organismo e al modo in cui inducono effetti biologici dose-risposta. È necessario procedere con una valutazione tossicologica caso per caso, tenendo in considerazione che argille diverse mostrano profili tossicologici differenti e che apportare loro delle modifiche può cambiare questi profili.

1.3 Uptake cellulare delle argille minerali

Le particelle di argilla, che possono entrare in contatto con le cellule, presentano dimensioni nanometriche e una distribuzione di carica anisotropa, è importante quindi valutare la risposta cellulare in seguito a questa interazione. Poiché le risposte fisiologiche a livello cellulare dipendono dall'assorbimento delle nanoparticelle (Zhang S. *et al.*, 2009; Zhang S. *et al.*, 2015), e dalle loro caratteristiche chimico-fisiche (Albanese A. *et al.*, 2012; Panariti A. *et al.*, 2012) è importante comprendere il meccanismo con cui le argille minerali vengono internalizzate per studiare la loro attività dal punto di vista biologico. Affinché le particelle possano essere endocitate a livello cellulare, la dimensione ottimale dovrebbe essere nell'ordine dei 25-30 nm. Mihaila S. *et al.* (2014) hanno osservato il comportamento della laponite, un'argilla colloidale strutturalmente caratterizzata da piccoli dischi il cui diametro è di 25-30 nm, a contatto con cellule stromali di derivazione adiposa. In seguito ad un trattamento con una dispersione di laponite, è stato possibile osservare tramite analisi di microscopia confocale, che questa viene internalizzata a livello citoplasmatico e si dispone inoltre a formare piccoli aggregati che si accumulano sulla membrana plasmatica (Figura

12). Il coinvolgimento del processo endocitico nell'internalizzazione cellulare è stato confermato tramite analisi di citometria a flusso. Marcando la laponite con la rodamina è stato possibile osservare, dopo aver trattato le cellule con colchicina per inibire l'endocitosi mediata da clatrina, una riduzione dell'internalizzazione pari a circa il 40% (Mihaila S.M. *et al.*, 2014).

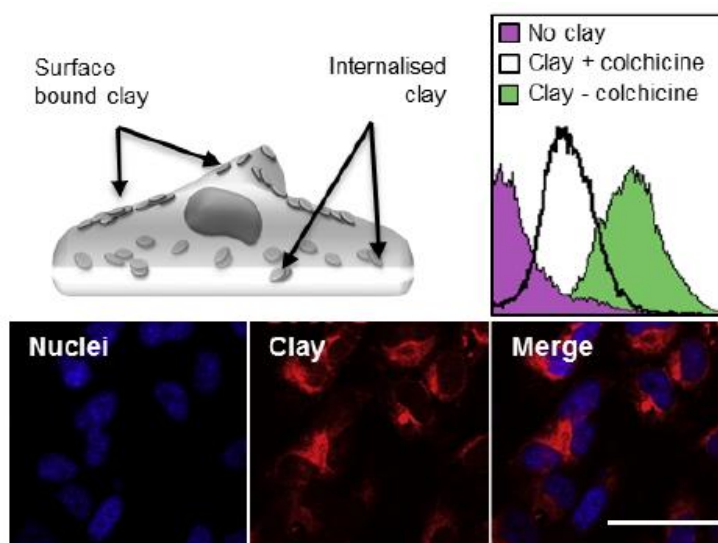


Figura 12. La laponite interagisce direttamente con le cellule stromali, localizzandosi a livello citoplasmatico e depositandosi sotto forma di piccoli aggregati sulla membrana plasmatica. È possibile osservare che la laponite marcata con rodamina, si distribuisce a livello citoplasmatico e nella zona perinucleare e si nota una diminuzione dell'internalizzazione in seguito a trattamento con colchicina, che inibisce l'endocitosi mediata da clatrina (Mihaila S.M. *et al.*, 2014).

Altri studi, hanno dimostrato che i processi di internalizzazione delle argille a livello cellulare non sono limitati soltanto all'endocitosi. Castro-Smirnov *et al.* (2017) hanno valutato i meccanismi di internalizzazione della sepiolite, un silicato idrato di magnesio con morfologia cristallina fibrosa, mettendo in evidenza che la colchicina è in grado di ridurre del 20% l'efficienza di internalizzazione della sepiolite, mentre il trattamento con amiloride, un inibitore della micropinocitosi, riduce del 50% l'internalizzazione suggerendo che la micropinocitosi possa rappresentare la principale via di assorbimento cellulare delle nanofibre di sepiolite. Per quel che riguarda i nanotubi di halloysite (HNT), un minerale con

composizione chimica simile alla kaolinite caratterizzato da una forma tubulare, non è ancora stato definito il preciso meccanismo attraverso cui vengono internalizzati a livello cellulare. Secondo lo studio condotto da Liu H. *et al.* 2019, in cui sono stati utilizzati HNT la cui superficie esterna è stata modificata per conferire loro proprietà fotoluminescenti, si ipotizza che in cellule epiteliali A549, i nanotubi possano essere internalizzati sfruttando l'endocitosi clatrina dipendente e l'endocitosi mediata da caveole (Figura 13). In funzione di un loro potenziale utilizzo come *carrier* di farmaci, diventa imperativo comprendere lo specifico meccanismo di assorbimento.

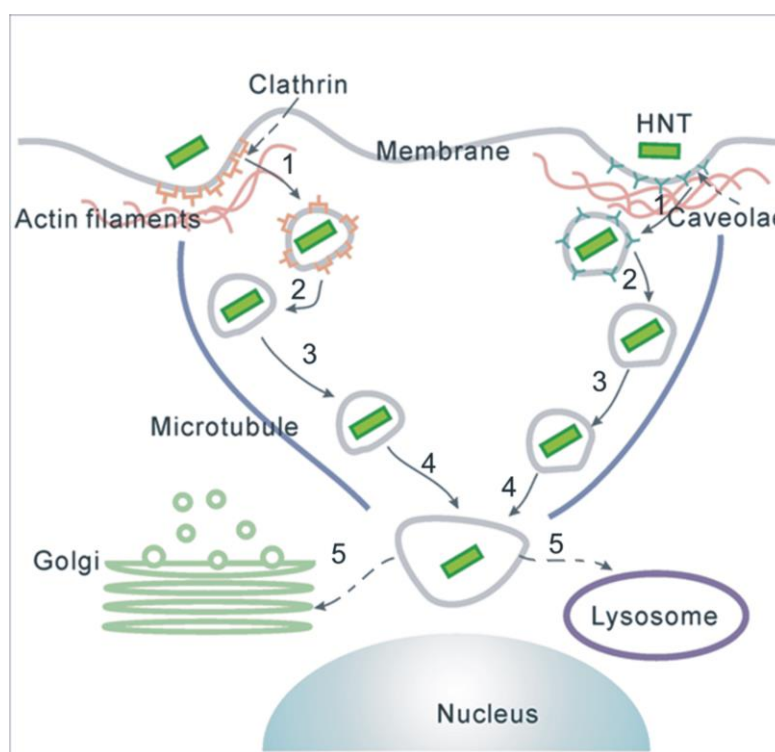


Figura 13. Modello ipotetico per l'internalizzazione di HNT in cellule epiteliali A549 (Liu H. *et al.*, 2019).

1.4 Argille minerali come *carrier* di farmaci

Grazie alle proprietà reologiche, all'elevata capacità di interazione e ai legami che possono stabilire con i biopolimeri, il ruolo delle argille minerali come *carrier* di farmaci è diventato oggetto di approfondite ricerche. L'applicazione delle nanoparticelle di argilla in questo

ambito, è attribuita alle loro particolari proprietà fisico-chimiche, tra cui le dimensioni, la morfologia e la densità di carica superficiale, che dipendono dal tipo di argilla minerale e dalla struttura cristallina che la caratterizza (Mousa M. *et al.*, 2018). È stato visto che alcuni tipi di argille minerali possono essere utilizzate per l'incapsulamento di farmaci o molecole naturali biologicamente attive, con la possibilità di aumentarne la stabilità proteggendoli dalla degradazione, di controllarne la velocità e il tempo di rilascio e di indirizzarli in siti specifici (Aguzzi C. *et al.*, 2007; Viseras C. *et al.*, 2010; Lazzara G. *et al.*, 2017). Negli Stati Uniti, le argille minerali sono classificate come “*Inactive Ingredients Database*” e vengono utilizzati come eccipienti nella produzione di alcune forme farmaceutiche in commercio (Carretero M.I., 2002; Park J.H. *et al.*, 2016; Yendluri R. *et al.*, 2017b). Sono diversi gli studi in letteratura a sostegno del loro utilizzo in questo ambito e che ne illustrano i vantaggi derivati dal loro impiego, sia per migliorare le proprietà organolettiche che per incrementarne la solubilità e la stabilità (Lee J.H. *et al.*, 2012; Oh Y.J. *et al.*, 2013). È noto, come introdotto in precedenza, che in seguito alla somministrazione di farmaci convenzionali si va incontro ad un rilascio immediato del principio attivo che può portare a fluttuazioni significative delle concentrazioni a livello plasmatico. Questo induce una variazione delle concentrazioni nell'organismo; il farmaco può raggiungere livelli inferiori alla concentrazione minima efficace o superare la massima concentrazione tossica, con la conseguente manifestazione di effetti collaterali o mancati benefici dal punto di vista terapeutico per il paziente. L'utilizzo di materiali che possano intervenire sul rilascio controllato dei farmaci, aiuterebbe a ridurre gli effetti indesiderati dovuti ai cambiamenti nella concentrazione aumentando l'effetto terapeutico del farmaco (Jafarbeglou M. *et al.*, 2016). La capacità delle particelle di argilla di legare le molecole biologiche, è nota alla comunità scientifica ormai da più di cinquant'anni. Nel passato infatti, è stato osservato che la concentrazione di alcuni farmaci nel flusso sanguigno si riduceva notevolmente quando ai pazienti venivano contemporaneamente somministrati trattamenti antidiarroici a base di

argilla, poiché questi avevano la capacità di legarli (Aguzzi C. *et al.*, 2007). Le interazioni farmaco-argilla quindi, possono essere sfruttate per la progettazione di sistemi capaci di indurre un rilascio controllato e ottenere vantaggi dal punto di vista biofarmaceutico (Rodrigues L.A. *et al.*, 2013). Grazie alla caratteristica struttura a strati delle argille minerali, in cui si alternano fogli tetraedrici e ottaedrici, i farmaci possono intercalarsi negli spazi intermedi e stabilire interazioni elettrostatiche, che nell'ambiente biologico attraverso lo scambio ionico portano ad un rilascio controllato. Mescolando substrati solidi quali le argille minerali (scambiatori di ioni), lo scambio ionico può avvenire con i farmaci in soluzione. A livello fisiologico, i controioni possono indurre il rilascio del farmaco dal substrato, che successivamente può essere eliminato o biodegradato (Figura 14) (Aguzzi C. *et al.*, 2007).

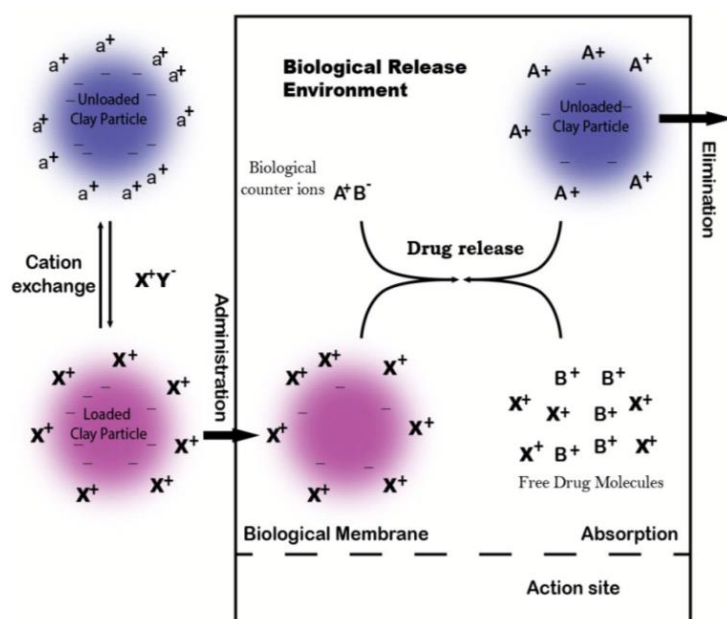


Figura 14. Modello proposto per la formazione del complesso argilla-farmaco e per i meccanismi di rilascio del farmaco *in vivo*. (Carica superficiale argilla minerale (-); cationi compensatori (a^+); farmaco cationico (X^+); anioni associati al farmaco (Y^-); controioni presenti a livello fisiologico (A^+); anioni associati ai controioni (B^-) (Aguzzi C. *et al.*, 2007).

Le interazioni che si possono stabilire tra un farmaco e i vari tipi di argille dipendono essenzialmente dal tipo di minerale argilloso e dai gruppi funzionali del farmaco, che possono portare allo sviluppo di interazioni differenti (per esempio legami a idrogeno,

scambio ionico, interazioni idrofile o idrofobiche, ecc.). In generale, la preparazione del complesso argilla-farmaco viene eseguita miscelando, in un opportuno rapporto volumetrico, una dispersione acquosa di argilla con una soluzione (acqua o solvente organico) contenente il farmaco. L'efficacia di incapsulamento del farmaco (in valore %) e il contenuto di farmaco (in valore %) nell'ibrido argilla-farmaco si ottengono secondo le equazioni (1) e (2) tramite indagine spettrofotometria e / o analisi termogravimetriche (Lazzara G. *et al.*, 2017).

$$1. \text{ Drug encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Mass of the drug loaded in the clay}}{\text{Mass of the total drug added}} \times 100$$

$$2. \text{ Drug content (\%)} = \frac{\text{Mass of the drug loaded in the clay}}{\text{Mass of the clay-drug composite synthesized}} \times 100$$

Bisogna però tenere in considerazione che possono esserci alcune limitazioni nell'utilizzo delle argille minerali come *carrier*, poiché queste possono stabilire forti interazioni con i farmaci influenzandone in maniera negativa la velocità di rilascio e limitandone quindi la biodisponibilità. Al fine di superare questi inconvenienti, negli anni sono state proposte diverse strategie e la migliore è risultata essere quella in cui si ricorre alla funzionalizzazione del vettore. Rivestendo il sistema ibrido farmaco-argilla con polimeri cationici, si ha la possibilità di controllare il rilascio del farmaco garantendo una somministrazione costante e prolungata nel tempo (Massaro M. *et al.*, 2018b). Per esempio, le due argille minerali kaolinite e halloysite, sono state utilizzate come supporto per il caricamento della Doxorubicina (DOX), un farmaco utilizzato per la terapia antitumorale, ottenendo in entrambi i casi una buona percentuale di caricamento (54% e 80% in peso rispettivamente per kaolinite e halloysite). È stato osservato che da entrambi questi sistemi, in presenza di soluzioni acide è possibile ottenere un significativo rilascio di DOX, confermando quindi la

presenza di interazioni elettrostatiche nel complesso argilla-farmaco. Simulando le condizioni del microambiente tumorale, in cui si ha un valore di pH acido (Kato Y. *et al.*, 2013), la percentuale di rilascio di DOX era pari al 30% in un lasso di tempo di 30 ore, contro il 5% rilasciato invece in condizioni di pH neutro (Li L. *et al.*, 2016; Zhang Y. *et al.*, 2016). Yendluri *et al.* (2017a) hanno utilizzato l'halloysite coniugata con il farmaco antitumorale Paclitaxel, ottenendo un rilascio controllato e prolungato nel tempo. Rawtani *et al.* (2017) hanno ideato un sistema in cui l'antibiotico "Ciprofloxacina" è stato veicolato utilizzando come supporto l'halloysite, incrementando la biodisponibilità della molecola. Questi sono soltanto alcuni degli studi presenti in letteratura che riguardano l'utilizzo delle argille minerali come *carrier* di farmaci, e si stima che nel corso degli anni ci sarà sempre più interesse per l'utilizzo di questi materiali come supporto inorganico per adsorbimento e desorbimento in composizioni farmaceutiche. Considerando quanto appena discusso e le innumerevoli proprietà delle argille minerali (Figura 15), risultano evidenti i vantaggi derivati dal loro possibile impiego per il trasporto di agenti terapeutici attraverso le barriere biologiche.



Figura 15. Proprietà delle argille minerali (Jafarbeglou M. *et al.*, 2016).

Capitolo 2

Halloysite

2.1 Halloysite

L'halloysite è un tipo di minerale con composizione chimica simile alla kaolinite e che presenta la seguente formula chimica $(\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4)_n\text{H}_2\text{O}$ (Prishchenko D.A. *et al.*, 2018; Santos A.C. *et al.*, 2018). Fu descritta per la prima volta nel 1826 dal chimico francese Pierre Berthier e prese successivamente il nome in onore del geologo belga Omalius d'Halloy, che la trovò nei giacimenti plumbo-zinciferi di Angleur, in Belgio (Churchman G.J. *et al.*, 1975).

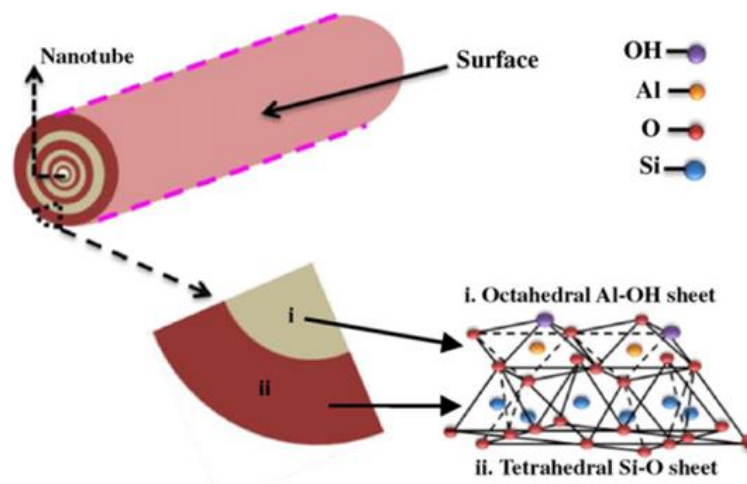


Figura 16. Rappresentazione grafica dei nanotubi di halloysite.

La nucleazione dei cristalli di halloysite avviene in diverse parti del mondo, come conseguenza dell'erosione delle rocce dovuta agli agenti atmosferici, della pedogenesi e dell'alterazione idrotermale di rocce ultramafiche (Joussein E. *et al.*, 2015; Wilson I. *et al.*, 2016). Molti paesi come Belgio, Nuova Zelanda, Brasile, Cina, Francia, Australia e Turchia sono ricchi in depositi di halloysite, ed è stato visto che al variare del deposito è possibile trovare caratteristiche differenti, ma che all'interno dello stesso queste vengono mantenute. Vista la natura tubulare dell'argilla spesso ci riferisce all' halloysite come nanotubi di halloysite (HNT), mettendo in risalto proprio la morfologia di questi ultimi (Figura 16).

2.2 Caratteristiche dell'halloysite

L'halloysite viene definita come un fillosilicato 1:1 in cui uno strato planare di silicati tetraedrici si alterna ad uno strato con geometria ottaedrica; questi sono legati insieme da ponti a ossigeno (Figura 17) (Teo Z.X. *et al.*, 2016).

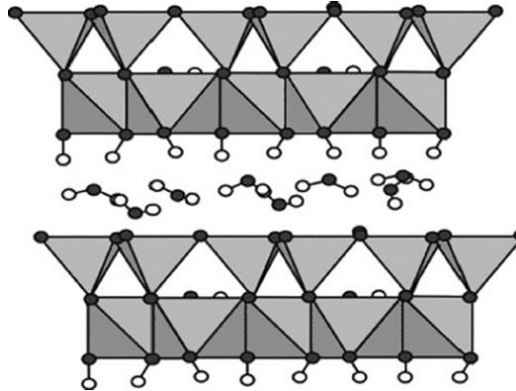


Figura 17. Rappresentazione grafica della struttura cristallina di HNT (Du M., *et al.*, 2010).

Tuttavia, in determinate condizioni geologiche, l'halloysite può assumere anche forme diverse da quella classica tubulare. Come mostrato in figura 18 infatti, è possibile distinguere anche una morfologia sferoidale, piatta e quasi arrotondata (Du M. *et al.*, 2009; Pasbakhsh P. *et al.*, 2013).

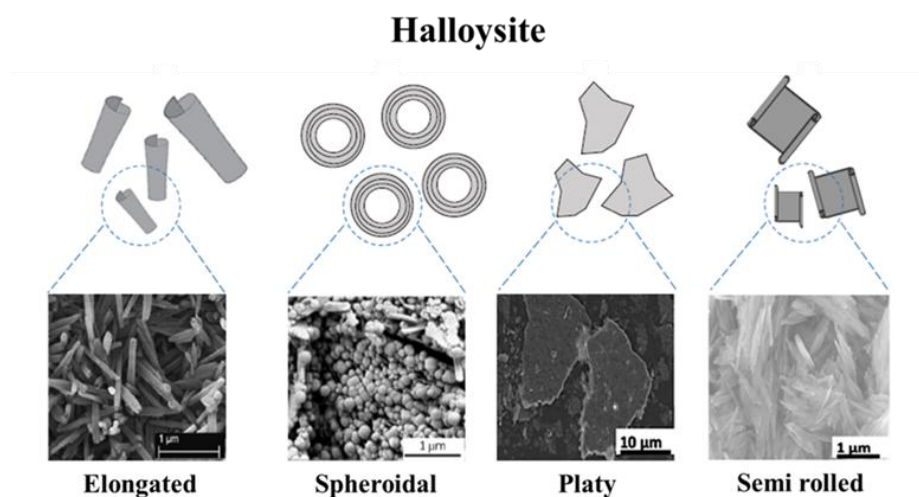


Figura 18. Rappresentazione delle differenti morfologie dell'halloysite con relative immagini di microscopia (De Oliveira M.T.G *et al.*, 2007; Abdullayev E. *et al.*, 2013a; Ramadass K. *et al.*, 2019).

Nei giacimenti “*Dragon Mine*” dello Utah (USA), l’halloysite è caratterizzata da un buon grado di purezza e si presenta come una pietra bianca che può facilmente essere trasformata in polvere morbida e fine (Figura 19). In alcuni giacimenti, la presenza di metalli come contaminanti, induce un cambiamento nella colorazione che diventa giallastra o marrone (Joussein E. *et al.*, 2005).



Figura 19. Halloysite pura e in polvere della miniera “*Dragon Mine*” dello Utah, USA

L’analisi strutturale tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (Figura 20) ha mostrato che nei depositi di Nuova Zelanda, Stati Uniti e Australia è presente halloysite con una morfologia prevalentemente tubulare ed eterogenea nelle dimensioni.

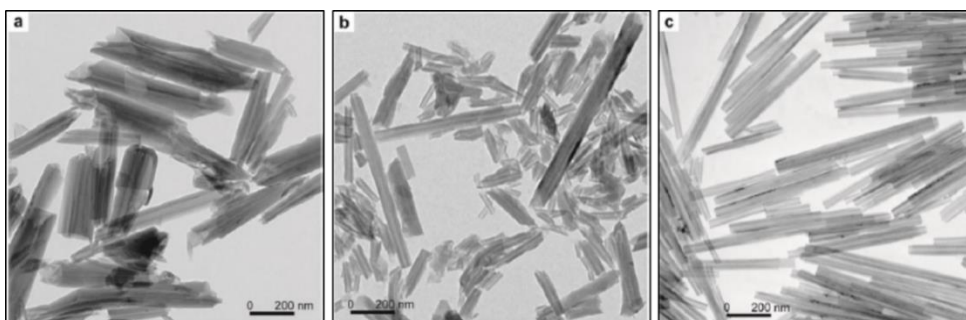


Figura 20. Immagini TEM halloysite (A) Nuova Zelanda, (B) Stati Uniti, (C) Australia con morfologia prevalentemente tubulare e dimensioni eterogenee (Pasbakhsh P. *et al.*, 2015).

In media, ciascun nanotubo è costituito da 10-15 doppi strati di alluminio-silicato (Figura 21) (Pasbakhsh P. *et al.*, 2015).

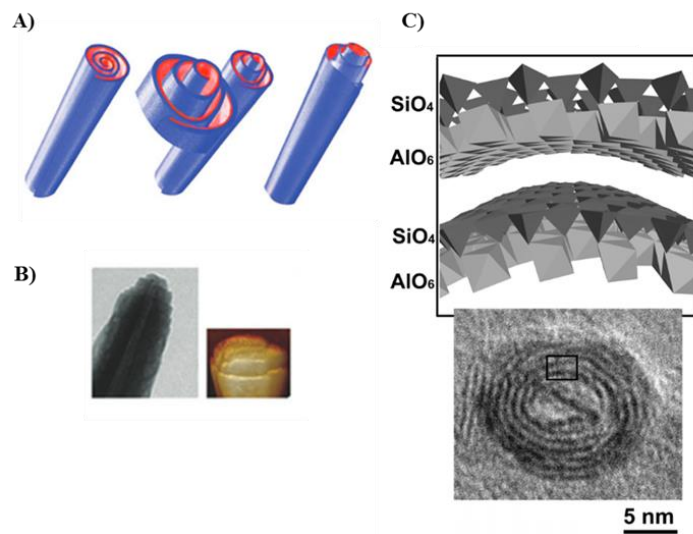


Figura 21. (A) Rappresentazione grafica dei vari strati dei nanotubi di halloysite, (B) Immagini microscopia elettronica a scansione (TEM) e microscopia a forza atomica (AFM) delle estremità dei nanotubi (Massaro M. *et al.*, 2017). (C) struttura a più pareti “multi-walled” dei nanotubi di halloysite, combinazione di fogli ottaedrici AlO₆ e tetraedrici SiO₄ (White R.D. *et al.*, 2012).

Un aspetto molto interessante è legato alla differente composizione chimica tra la superficie interna ed esterna, in cui sono presenti rispettivamente gruppi alluminolici (Al-OH) che conferiscono una carica positiva e silossanici (Si-O-Si) che conferiscono carica negativa (Figura 22) (Guimaraes L. *et al.*, 2010; Joo Y. *et al.*, 2013).

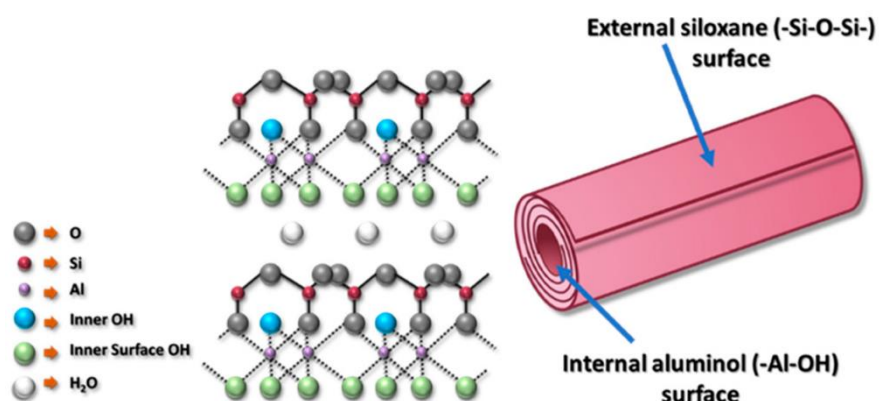


Figura 22. Rappresentazione dei nanotubi di halloysite (HNT) in cui si evidenzia la differente composizione chimica della superficie interna ed esterna (Kamal N. *et al.*, 2020).

Le cariche differenti che caratterizzano le superfici esterne ed interne dei nanotubi, sono dovute alle diverse proprietà dielettriche e di ionizzazione del silicio e degli ossidi di alluminio. Per valori di pH compresi tra 3 e 10, le cariche negative si distribuiscono sulla superficie esterna, le cariche positive nel lume interno e sui bordi si ha carica negativa/positiva. Come conseguenza della struttura tubulare, sulla superficie esterna sono presenti soltanto pochi gruppi idrossilici, che si trovano invece maggiormente concentrati nel lume interno che risulta quindi più reattivo. Infatti, per l'halloysite è possibile classificare tre tipologie di Al-OH, in base al loro posizionamento in superficie, alle estremità e tra i foglietti ottaedrici e tetraedrici, come rappresentato in figura 23. Tutti possono essere reattivi e dissociarsi in base al pH delle soluzioni, tranne quelli posti tra i foglietti ottaedrici e tetraedrici a causa dell'ingombro sterico.

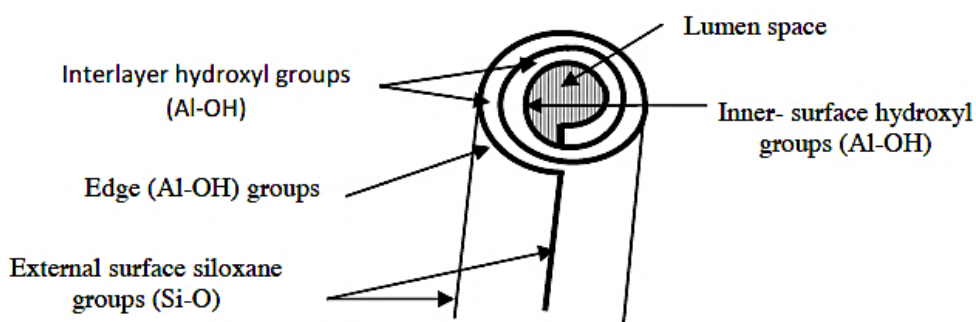


Figura 23. Disposizione dei gruppi Al-OH in HNT (Szpilska K. *et al.*, 2015).

In tabella 2 è possibile osservare come i gruppi funzionali distribuiti lungo la struttura dei HNT, influenzino la carica superficiale e la relativa reattività in risposta ai cambiamenti di pH.

Functional group	Location in HNT's crystallographic structure	Reactivity	pH dependence
Aluminol groups	Surface of octahedral sheet	Reactive	pH dependent
Aluminol groups	Between octahedral and tetrahedral sheet	Not reactive	pH dependent
Siloxane bridges	Tetrahedral sheet	Not reactive	Permanent negative charge
Aluminol groups	Edges	Reactive	pH dependent
Silanol groups	Edges	Reactive	pH dependent

Tabella 2.

Le dimensioni dei nanotubi di halloysite possono variare in base al sito di estrazione e in base al processo di purificazione cui vanno incontro, ma di solito hanno un diametro interno compreso tra 10-30 nm, un diametro esterno compreso tra 40-70 nm (Abdullayev E. *et al.*, 2013b; Abdullayev E. *et al.*, 2015) e una lunghezza compresa tra 500 e 1000 nm (Figura 24) (Yah W.O. *et al.*, 2012a). In alcuni depositi sono stati trovati nanotubi con una lunghezza compresa tra 3 e 5 μm , anche se quelli con dimensioni inferiori risultano più interessanti dal punto di vista biologico, poiché più adatti per l'utilizzo come *carrier* di farmaci (Massaro M. *et al.*, 2020a).

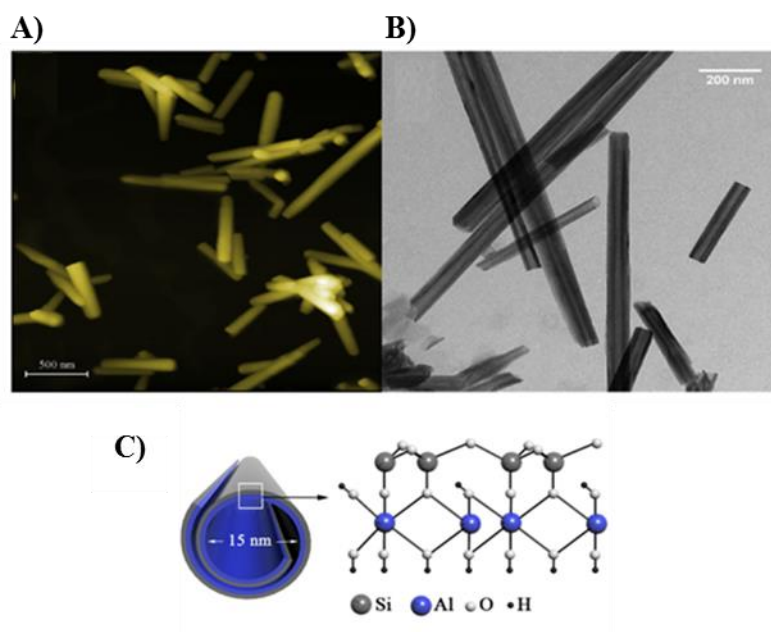


Figura 24. Immagini di microscopia a forza atomica (AFM) (A) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (B) di nanotubi di halloysite precipitati da una dispersione acquosa (Yendluri R. *et al.*, 2017a); (C) Rappresentazione grafica di HNT (Yah W.O. *et al.*, 2012b).

I doppi strati di halloysite sono separati da un monostrato di acqua, ed è stato visto che l'acqua presente tra i vari strati può essere classificata come “hole” e “associated”. Nel primo caso, le molecole d'acqua sono posizionate sulla superficie del foglio tetraedrico con orientamento diverso e realizzano legami idrogeno con gli ossigeni basali. L'acqua definita “associated” invece, ha un maggiore grado di mobilità a temperatura ambiente e può essere persa più velocemente rispetto all'altro tipo (Yuan P. *et al.*, 2016). In base alla presenza o meno di acqua tra i vari strati è possibile classificare l'halloysite come idratata e disidratata. Quando i HNT sono in uno stato idratato, il valore di n nella formula chimica $(Al_2Si_2O_5(OH)_4nH_2O)$ è uguale a 2 e possono essere indicati come “HNT-10Å”. Se sottoposti ad una temperatura di circa 110 °C, l'umidità tra gli strati evapora dando luogo a quelli che vengono chiamati “HNT-7Å”, in cui il valore di n sarà pari a 0 (Figura 25) (Hillier S. *et al.*, 2002; Fisher G.B. *et al.*, 2006). L'halloysite idratata si trova solitamente in profondità nel terreno e si stima che la quantità di acqua interstrato sia pari al 12,3% circa in peso (Vašutova V. *et al.*, 2013).

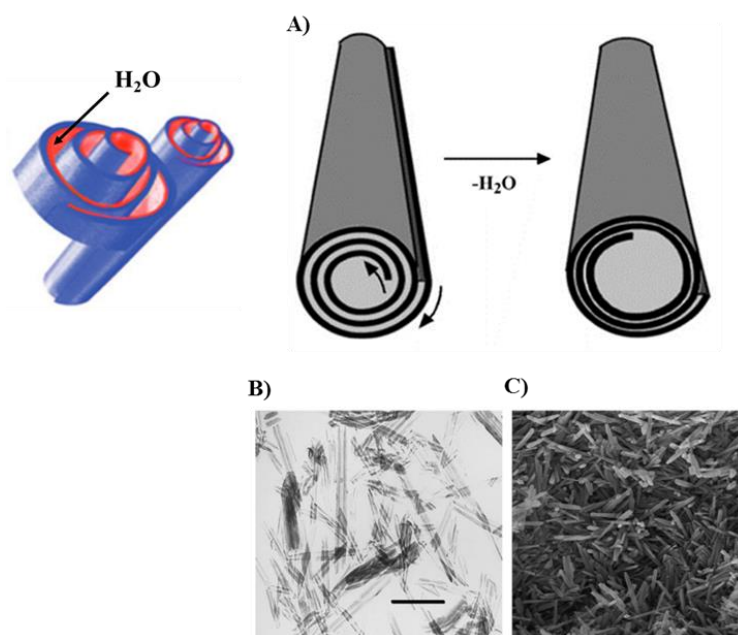


Figura 25. (A) “HNT-10Å” che in seguito al processo di disidratazione diventa “HNT-7Å”; (B) Immagine TEM dispersione acquosa HNT; (C) Immagine SEM HNT in polvere. HNT giacimento *Dragon Mine* (USA) (Lvov Y. *et al.*, 2014).

Il processo di disidratazione è graduale ed irreversibile, passa attraverso due stati intermedi in cui l'interspazio tra i vari strati si riduce progressivamente a 8.6 Å e 7.9 Å (Churchman G. *et al.*, 1984; Pasbakhsh P. *et al.*, 2013) fino ad arrivare a 7.2 Å. Questo processo, oltre ad essere irreversibile, può avere alcuni effetti dal punto di vista strutturale. Si può avere la riduzione delle dimensioni delle particelle, una variazione del diametro le cui dimensioni possono aumentare del 10-15% e *unfolding* del nanotubo, la cui struttura è mantenuta grazie ai legami ad idrogeno tra gli strati che ne impediscono il completo srotolamento (Lvov Y.M. *et al.*, 2013). In generale, è possibile classificare le superfici dei nanotubi in tre tipologie, ognuna di queste caratterizzata da una reattività specifica e può andare incontro a modifiche differenti:

- La superficie del lume interno, presenta carica positiva ed è coperta da gruppi Al-OH. Può andare incontro a modifiche covalenti tramite cui possono essere aggiunti determinati gruppi funzionali. Questo metodo permette di immobilizzare sulla superficie del lume diversi gruppi organici in maniera stabile.
- La superficie silossanica esterna, presenta carica negativa e viene riconosciuta come chimicamente inerte e non disponibile per legami chimici con composti organici. Può essere modificata mediante rivestimento con sostanze cationiche, quali per esempio polimeri, biopolimeri e tensioattivi. Questo tipo di modifica può aiutare a migliorare la dispersibilità e la biocompatibilità dell'halloysite.
- Le superfici interstrato, tenute insieme da ponti idrogeno, possono essere modificate mediante intercalazione diretta o indiretta di piccole molecole organiche e alcuni sali cationici monovalenti. Questo tipo di modifica come conseguenza può portare ad un indebolimento dei legami idrogeno interstrato e ad un aumento della superficie tra i vari strati che può essere inteso come spazio aggiuntivo per il caricamento o adsorbimento (Tan D. *et al.*, 2016).

I nanotubi di halloysite contrariamente ad altri tipi di nanomateriali con morfologia tubulare, quali per esempio i nanotubi di carbonio, sono di origine naturale, sono abbondantemente presenti in natura ed hanno un basso costo. Queste caratteristiche, unitamente alle loro proprietà strutturali appena discusse e alla loro elevata biocompatibilità, li rendono molto attraenti per svariate applicazioni.

2.3 Biocompatibilità dell'halloysite

Come introdotto precedentemente, il principale vantaggio derivato dall'utilizzo dei HNT rispetto ad altri nanomateriali simili è la loro biocompatibilità. Fakhrullina *et al.* (2015), hanno valutato *in vivo* la tossicità dei nanotubi di halloysite utilizzando come organismo modello il nematode *Caenorhabditis elegans*. Quest'ultimo nel corso degli anni è stato ampiamente utilizzato per svariati studi biologici tra cui test di tossicità; è considerato uno strumento importante dal punto di vista molecolare in quanto il suo genoma, che è stato totalmente sequenziato, presenta una elevata omologia con il genoma umano. I risultati hanno dimostrato che i HNT, all'interno delle concentrazioni investigate (HNT [0,05-1] mg/ml), non risultano essere tossici per il nematode. Inducono soltanto uno stress meccanico a livello dell'apparato digerente, che viene ripristinato una volta terminato il trattamento (Fakhrullina G.I. *et al.*, 2015). Uno studio fitotossico condotto su *Raphanus sativus* ha messo in evidenza che i nanotubi di halloysite non influenzano il processo di germinazione, la differenziazione dello xilema e lo sviluppo, dimostrando quindi una elevata biocompatibilità anche nei confronti delle specie vegetali (Bellani L. *et al.*, 2016). Vergaro *et al.* (2010) hanno valutato la citotossicità e l'internalizzazione dei nanotubi di halloysite, utilizzando due tipologie di HNT: *pristine* (non modificati) e funzionalizzati con fluorescina isotiocianato-FITC (per renderli fluorescenti e poterne seguire l'internalizzazione a livello cellulare). Per poter funzionalizzare i nanotubi con il FITC, questi sono stati modificati con APTES (3-Aminopropyl)triethoxysilane) e tramite la tecnica *layer-by-layer* (LbL) per l'adsorbimento

selettivo di policationi e polianioni. Come sistema modello sono state utilizzate due differenti linee cellulari tumorali umane (HeLa adenocarcinoma della cervice uterina e MCF7 carcinoma della mammella) e come mostrano i risultati in figura 26, la vitalità cellulare rimane prossima al 70% per una concentrazione di halloysite pari a $[75\mu\text{g/mL}]$ per entrambe le linee cellulari. Inoltre, è stato dimostrato che i HNT vengono internalizzati a livello cellulare, suggerendo quindi che potrebbero essere presi in considerazione per un potenziale utilizzo come sistemi di *drug carrier* e *delivery* (Vergaro V. *et al.*, 2010).

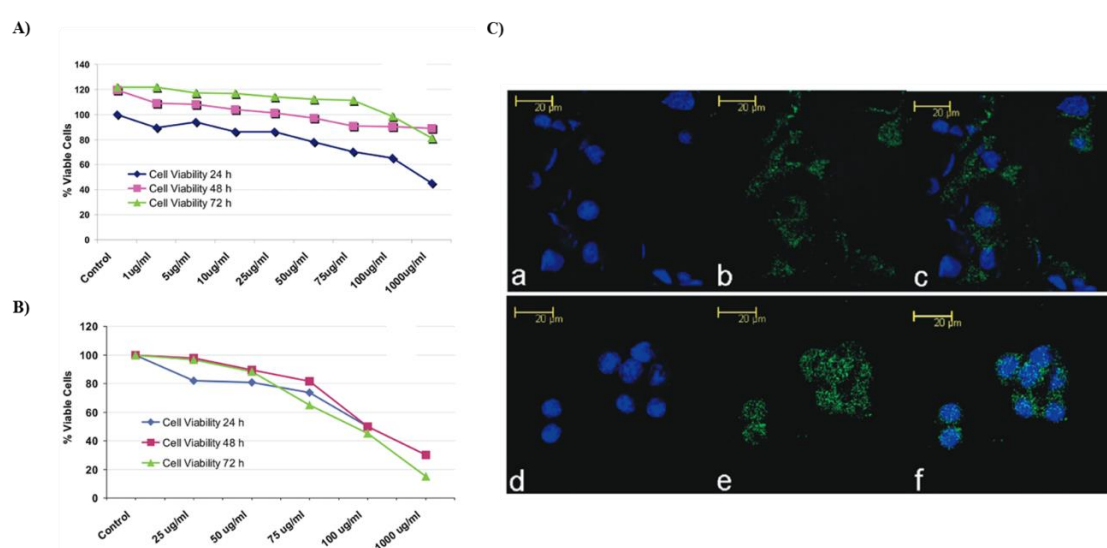


Figura 26. Saggi di vitalità cellulare e *uptake* in cellule HeLa e MCF7 trattate con HNT. Saggio MTT condotto su cellule HeLa (A) e MCF7 (B) trattate per 24-48-72 h con concentrazioni crescenti di HNT+APTES. (C) Immagini CLSM per lo studio dell'internalizzazione di HNT da parte di cellule HeLa e MCF7. (a-c) Cellule MCF7 trattate per 3h con Lbl coated HNT/FITC. (d-f) Cellule HeLa trattate per 3h con HNT/APTES/FITC.

Kamalieva *et al.* 2018 hanno valutato l'internalizzazione e la tossicità dei nanotubi di halloysite *pristine* utilizzando come sistema modello cellule epiteliali umane di adenocarcinoma (A549) e fibroblasti umani primari della pelle (HSF). Per valutare la citotossicità, le cellule A549 sono state trattate per 24 h con concentrazioni crescenti di HNT *pristine* (da 5 a 75 μg per 10^5 cellule). Al termine del trattamento sono stati eseguiti diversi test per valutare l'attività biochimica delle cellule. Il test della lattico deidrogenasi (LDH),

per valutare l'attività del lattato idrogenasi nel mezzo extracellulare, che è un indicatore di morte cellulare indotta da danno alla membrana plasmatica; test Resazurina per monitorare le attività metaboliche delle cellule; test *Neutral red* per monitorare la funzione lisosomale. Inoltre, è stato eseguito anche un saggio MTT sia su cellule A549 che su cellule HSF per valutare l'attività delle deidrogenasi mitocondriali. Entrambe le linee cellulari sono state trattate per 24-48-72 h con diverse concentrazioni di HNT, come indicato in figura 27. I risultati sulle cellule A549 evidenziano che i nanotubi sono ben tollerati fino ad una concentrazione di 75 μg per 10^5 cellule. Sulla base dei dati ottenuti in seguito al saggio MTT, è emerso che per entrambe le linee cellulari, la concentrazione inibente (IC_{50}) è di circa 300 μg di HNT per 10^5 cellule.

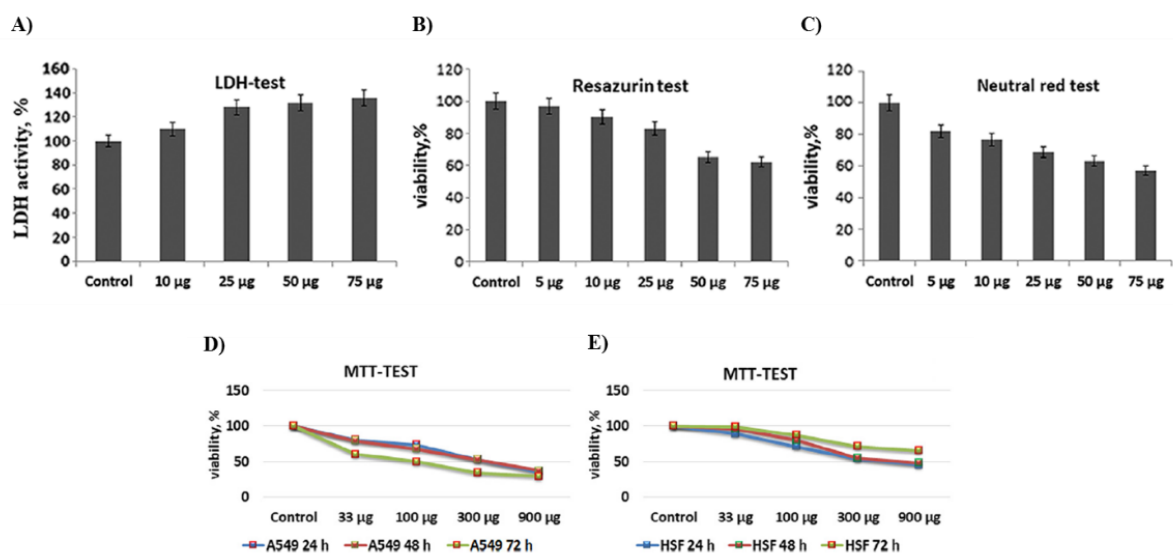


Figura 27. Test di vitalità cellulare su linee cellulari A549 e HSF. (A) Test LDH su cellule A549 trattate per 24 h con diverse concentrazioni di HNT (da 10 a 75 μg per 10^5 cellule); (B) Test Resazurina su cellule A549 trattate per 24 h con HNT (da 5 a 75 μg per 10^5 cellule); (C) Test *Neutral red* su cellule A549 trattate per 24 h con HNT (da 5 a 75 μg per 10^5 cellule); (D) Saggio MTT su cellule A549 e HSF dopo 24-48-72 h di trattamento con diverse concentrazioni di HNT (da 33 a 900 μg per 10^5 cellule).

È importante sottolineare che nel nostro organismo non è contemplata la presenza di meccanismi fisiologici deputati alla degradazione degli alluminosilicati e la loro somministrazione per via endovenosa potrebbe causare alcuni problemi. I nanotubi di halloysite quindi, potrebbero essere utilizzati per una somministrazione tramite via orale o per via topica. Wang *et al.* (2018) hanno valutato in topo l'eventuale tossicità epatica indotta da HNT, in seguito a somministrazione per via orale. I nanotubi di halloysite purificati sono stati somministrati a diverse concentrazioni, per un periodo di tempo pari a 30 giorni. I risultati hanno mostrato che, fino ad una concentrazione di 5mg/Kg di peso corporeo, questi erano ben tollerati e non inibivano in alcun modo la crescita (Figura 28). In seguito alla somministrazione di dosi più elevate invece, si assisteva ad un accumulo di Al e Si nel fegato, con conseguente stress ossidativo e disfunzione epatica. Alla luce dei risultati ottenuti, è emerso quindi che in topo i HNT se somministrati a dosi ≤ 5 mg/Kg di peso corporeo non inducono tossicità. Questo porta a considerare che potrebbero essere utilizzati anche nell'uomo, in quanto le concentrazioni da somministrare sarebbero generalmente inferiori a 5 mg/Kg di peso corporeo (Wang X. *et al.*, 2018).

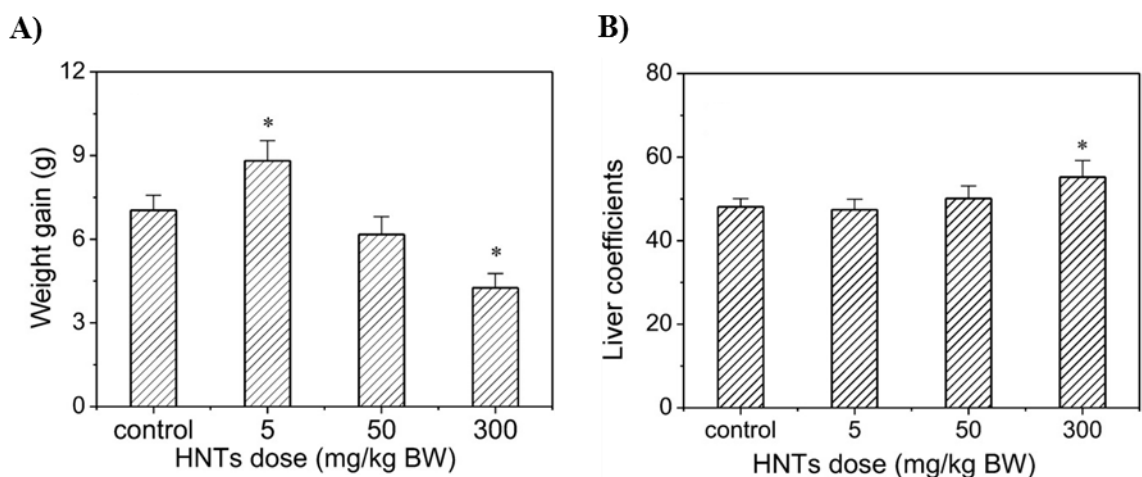


Figura 28. (A) Monitoraggio del peso corporeo in seguito alla somministrazione di diverse dosi di HNT. (B) Misurazione dei coefficienti epatici dopo 30 giorni di somministrazione orale di HNT a diverso dosaggio (Wang X. *et al.*, 2018).

Inoltre, è stato dimostrato anche che l'halloysite non induce effetti citotossici nei confronti di altre linee cellulari umane, come per esempio cellule tumorali tiroidee (Riela S. *et al.*, 2014; Massaro M. *et al.*, 2015) o epatiche (Massaro M. *et al.*, 2016). Questi sono soltanto alcuni degli studi presenti in letteratura che dimostrano la biocompatibilità dei nanotubi di halloysite e che ci aiutano a comprendere come questi possano trovare numerosi impieghi in campo biomedico.

2.4 HNT come *carrier* di farmaci

Grazie alle loro proprietà fisico-chimiche del tutto uniche, i nanomateriali con strutture tubolari hanno mostrato un grande potenziale nelle applicazioni biomediche. Tra quelli più studiati ci sono i nanotubi di carbonio (CNT), anche se è emerso che l'esposizione a livelli elevati di CNT potrebbe avere effetti negativi sulla salute, come la progressione dell'aterosclerosi (Cao Y. *et al.*, 2019; Moller P. *et al.*, 2016), fibrosi polmonare (Dong J. *et al.*, 2016) e genotossicità (Moller P. *et al.*, 2017). I nanotubi di halloysite invece, grazie alla loro elevata biocompatibilità e alla cavità interna che permette di caricare molecole di diversa natura, possono essere utilizzati come sistemi per il trasporto e il rilascio controllato. La limitata quantità di molecole che possono essere caricate nel lume e il loro rilascio veloce a causa delle interazioni deboli stabilite, sono degli inconvenienti da tenere in considerazione quando si decide di utilizzare i HNT come sistemi di *drug carrier* e *delivery*. Una possibile soluzione potrebbe essere quella di modificare le proprietà di superficie con l'obiettivo di incrementare la capacità di carico, ma anche al fine di aumentare l'affinità per il cargo, in maniera tale da rallentarne anche il rilascio. Per esempio, è stato visto che quando i nanotubi di halloysite *pristine* (non modificati) vengono utilizzati come *carrier* per l'ibuprofene, si ottiene una bassa percentuale di caricamento e un rilascio rapido poiché le uniche interazioni stabilite tra i nanotubi e la molecola sono di tipo debole (Van der Waals). Quando invece la superficie dei nanotubi viene modificata con APTES, si generano interazioni elettrostatiche

di tipo attrattivo tra il gruppo -COO dell'ibuprofene e del gruppo amminopropilico NH_3^+ dell'APTES, portando ad un incremento della percentuale di ibuprofene caricato e ad un ritardo del rilascio dal lume dei nanotubi (Tan D. *et al.*, 2014). La carica positiva del lume rende i HNT dei perfetti “*nanocontainer*” per molecole che presentano una scarsa stabilità o sono poco solubili in mezzo acquoso. Il caricamento dei composti nel lume è dovuto alle interazioni elettrostatiche che si stabiliscono tra i composti che presentano carica negativa e la superficie interna dei nanotubi che ha carica positiva (Massaro M. *et al.*, 2020a). A tal proposito, esistono numerosi studi in letteratura che riportano l'utilizzo dei nanotubi di halloysite come piccoli container in grado di ospitare molecole biologicamente attive e farmaci. Nel 2001 per la prima volta Price *et al.*, ne hanno descritto l'utilizzo per l'incapsulamento ed il successivo rilascio di tre composti Nicotinammide Adenina Dinucleotide (NAD), Ossitetraciclina HCl e Kellina, dimostrando che i HNT erano capaci di “intrappolare” queste sostanze e di rilasciarle in maniera più o meno controllata (Price R.R. *et al.*, 2001). Veerabadran *et al.* (2007) hanno sfruttato la carica positiva presente nel lume dei nanotubi con l'obiettivo di caricare al suo interno tre molecole, Nifedipina, Furosemide e Desametasone. Tutti e tre questi farmaci presentano una carica negativa e sono scarsamente solubili in acqua (la solubilità massima del Desametasone in acqua è di 0,1 mg/ml, per la Nifedipina è di 0,05 mg/ml e per la Furosemide è di 0,1 mg/ml), quindi per il caricamento sono stati utilizzati solventi acquosi contenenti il 10% di alcol, con l'obiettivo di ottenere una maggiore solubilità per le molecole. Gli studi sulla cinetica di rilascio, per simulare le condizioni fisiologiche, sono stati effettuati ad un valore di pH pari a 7.4. I risultati hanno dimostrato che il rilascio dei farmaci dai nanotubi di halloysite avviene in un lasso di tempo maggiore rispetto ai microcristalli. Osservando le tre curve di rilascio in figura 29, si nota che il rilascio inizia con una scarica iniziale nei primi 10 minuti e continua poi in maniera costante per circa 6 ore.

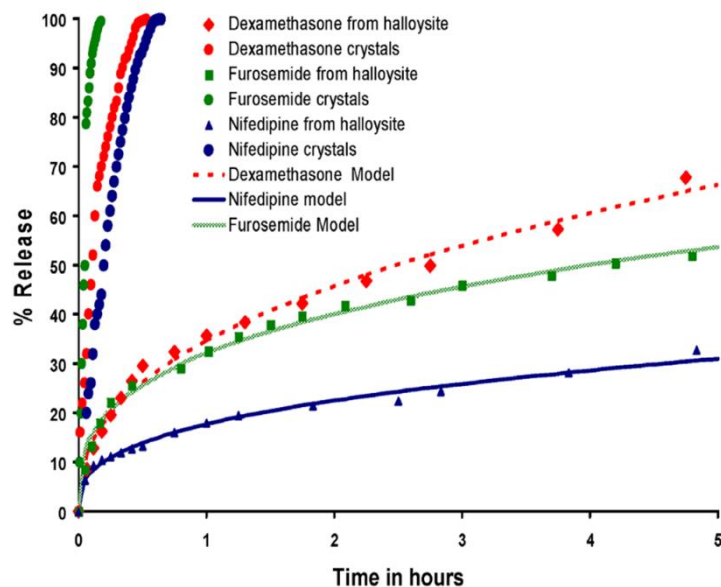


Figura 29. Profilo di rilascio del Desametasone (rosso), Furosemide (verde) e Nifedipina (blu) dai nanotubi di halloysite a pH7.4 (Veerabadran *et al.*, 2007).

Probabilmente, la scarica iniziale è dovuta al rilascio dei farmaci legati blandamente sulla superficie esterna dei nanotubi. Massaro *et al.* (2018) hanno proposto un sistema ibrido in cui l'insulina è stata caricata sia sulla superficie interna che esterna, massimizzando le interazioni elettrostatiche tra la proteina e i nanotubi. L'insulina oltre ad essere poco solubile, gode di una scarsa biodisponibilità poiché va incontro a rapida degradazione e digestione da parte di enzimi proteolitici, ma utilizzando questo sistema è stato visto che l'ibrido HNT/insulina si dimostra stabile per circa 90 giorni. Il rilascio di insulina dai HNT è stato studiato mimando le condizioni fisiologiche a 37 °C in tampone fosfato a pH 7.4, ed è stato osservato che circa il 20% di insulina viene rilasciata nelle prime 10 ore e il rilascio prosegue successivamente per circa 120 ore (Figura 30).

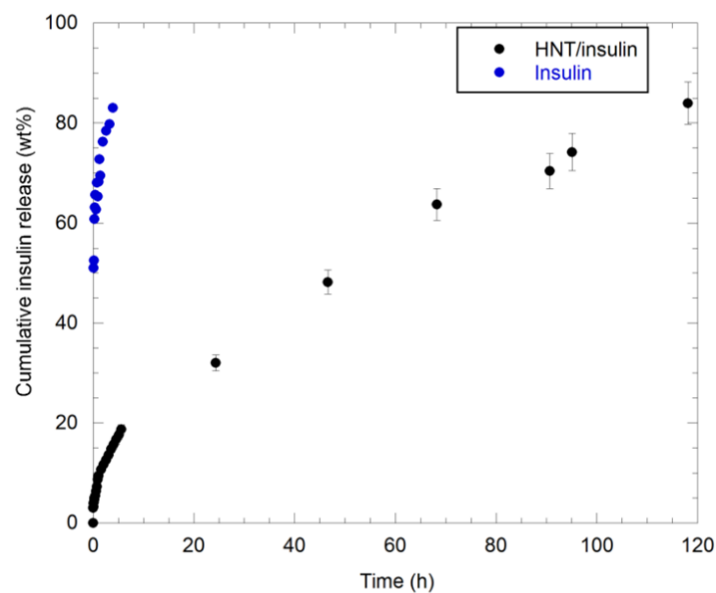


Figura 30. Cinetica di rilascio dell'insulina dall'ibrido HNT/insulina a 37 °C in tampone fosfato pH 7.4 (Massaro M. *et al.*, 2018a).

Grazie a questo sistema, oltre ad ottenere un rilascio controllato e prolungato nel tempo, si potrebbe aumentare la stabilità e quindi la biodisponibilità dell'insulina (Massaro M. *et al.*, 2018a). Considerando lo studio di Sun J. *et al.* (2017), in cui si dimostra che il caricamento di alcuni enzimi nel lume dei nanotubi migliora la loro stabilità e provvede a conferire loro una attività biologica prolungata nel tempo, Khodzhaeva V. *et al.* (2017) si sono concentrati sullo studio dell'azione antitumorale della RNAsi Binase veicolata da HNT. La Binase è una RNAsi di *Bacillus pumilus* ed ha la capacità di innescare la risposta apoptotica a livello delle cellule tumorali che esprimono l'oncogene RAS mutato. In particolare, è stato visto che ha la capacità di indurre citotossicità selettiva verso alcune cellule tumorali attraverso un legame diretto con RAS, ma dopo la somministrazione perde attività terapeutica poiché va incontro a degradazione. Da qui l'idea di utilizzare i nanotubi di halloysite come *carrier*, utilizzando come sistema modello cellule di adenocarcinoma del colon umane (Colo 320). La superficie esterna dei nanotubi è stata rivestita con destrina affinché l'enzima potesse essere incapsulato nella cavità interna per aumentarne la stabilità e la sua attività biologica.

I risultati hanno dimostrato un efficiente caricamento dell'enzima nella cavità dei nanotubi, con conseguente attività antitumorale nei confronti della line cellulare Colo 320 (Figura 31).

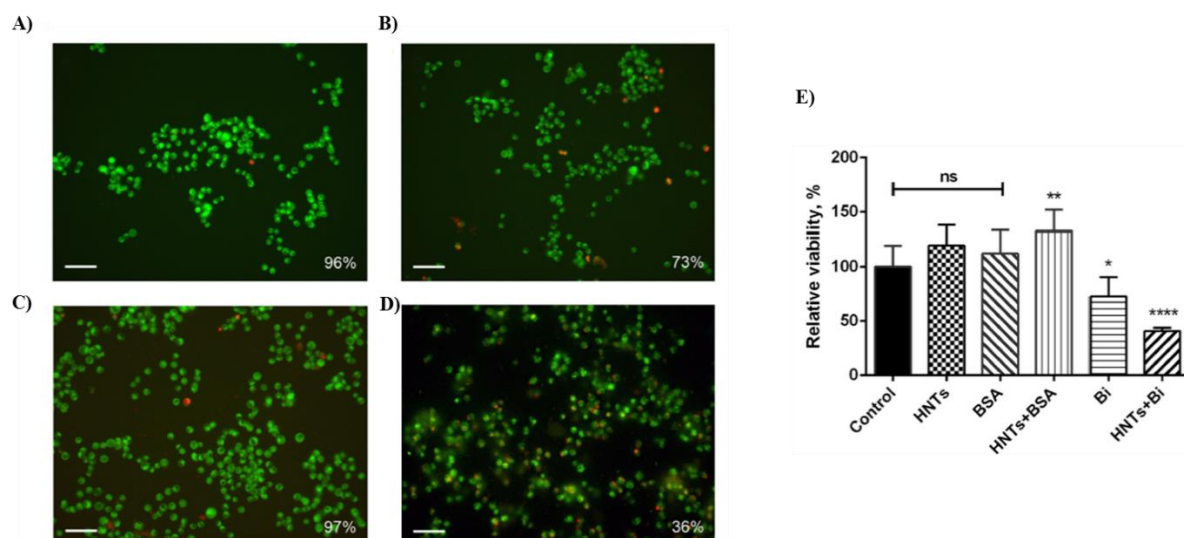


Figura 31. Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule Colo 320 (A) dopo 24 h di incubazione con binase (B), HNT (C) e HNT/binase (D). Cellule marcate con 3,30-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6) e ioduro di propidio. Le cellule vitali mostrano una fluorescenza nel verde, le cellule morte nel rosso. (E) Citotossicità di HNT/Binase nei confronti di cellule Colo 320 (Khodzhaeva V. *et al.*, 2017).

Wu Y.P. *et al.* (2018) hanno proposto lo sviluppo di un nanosistema da impiegare per il trattamento del cancro al seno, in cui la superficie dei nanotubi di halloysite caricati con Doxorubicina (Dox) è stata modificata mediante funzionalizzazione con PEG (glicole polietilenico) e acido folico (HNTs-PEG-FA) (Figura 32). Le cellule MCF-7 (cellule di carcinoma della mammella umane) sono state scelte come sistema modello, poiché presentano sovra espressione dei recettori per l'acido folico. I risultati hanno dimostrato che il sistema ottenuto è in grado di rilasciare Dox fino a 35 ore in un ambiente con pH acido (pH 5.3), e che può indurre morte cellulare in cellule MCF7 che esprimono il recettore per l'acido folico, mentre mostra bassa citotossicità nei confronti di cellule L02 (epatociti fetali umani) che non esprimono il recettore per l'acido folico. Questo quindi potrebbe rappresentare un valido sistema per la terapia mirata contro il carcinoma mammario.

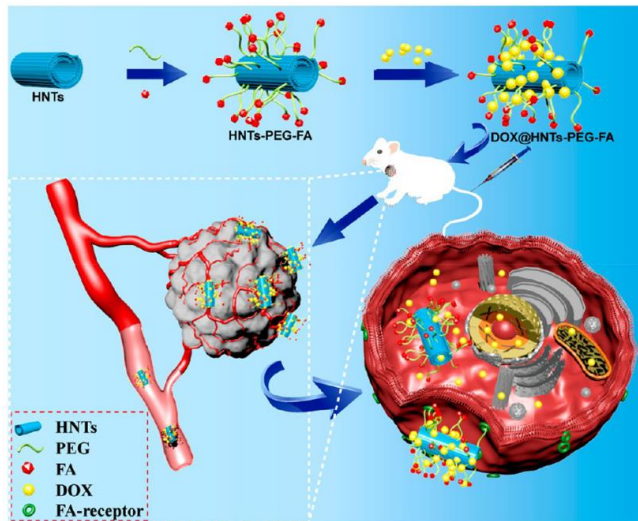


Figura 32. Illustrazione della procedura di sintesi del sistema ibrido HNTs-PEG-FA e rilascio mirato di DOX in cellule tumorali (Wu Y.P. *et al.*, 2018).

Inoltre, la ricerca si è focalizzata anche sullo sviluppo di nano-architetture più complesse, per esempio con l'obiettivo di ottenere dei sistemi capaci di rilasciare il farmaco solo in risposta a determinati stimoli, o capaci di trasportare anche più farmaci contemporaneamente. A tale scopo Dzamukova M. *et al.* (2015) hanno pensato alla progettazione di un

sistema per il trasporto di un farmaco, da utilizzare per esempio nei trattamenti antitumorali, che potesse essere rilasciato soltanto in risposta ad uno stimolo. Sono stati utilizzati dei nanotubi di halloysite nel cui lume è stato caricato il *brilliant green* (per simulare il farmaco) e le cui estremità sono state sigillate tramite aggiunta di destrina (Figura 33).

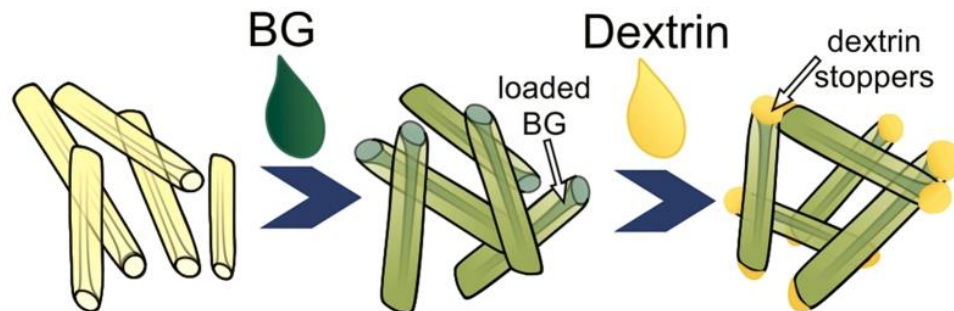


Figura 33. Rappresentazione del sistema ipotizzato da Dzamukova M. *et al.* (2015), in cui le estremità dei nanotubi di halloysite sono state sigillate da tappi di destrina, evitando la fuoriuscita del BG dal lume.

Una volta attraversata la membrana cellulare, le glicosidasi possono degradare le destrine poste a chiudere le estremità dei nanotubi, innescando il rilascio dal lume del *brilliant green*. Sfruttando lo stesso principio, per un loro ipotetico utilizzo tramite somministrazione per via orale, si potrebbe pensare di chiudere le estremità dei nanotubi con alcuni polimeri sensibili

al pH, che resistono a valori di pH molto bassi (1-3), ma che si dissolvono per esempio a livello intestinale dove sono presenti valori di pH più alti (5-8), veicolando e proteggendo il farmaco fino alla zona di rilascio. Allo stesso modo, si potrebbero utilizzare polimeri muco-adesivi come il chitosano per funzionalizzare i nanotubi, ottenendo la ritenzione del nanosistema nel colon con conseguente aumento della biodisponibilità del farmaco trasportato (Kruif J.K. *et al.*, 2016). Oltre a sfruttare la cavità interna, è possibile adsorbire (o aggiungere tramite legame covalente) le molecole sulla superficie esterna dei nanotubi. Combinando entrambe le cose, si potrebbe ottenere un sistema in grado di rilasciare inizialmente il farmaco dalla superficie esterna e a seguire, in maniera lenta e controllata, quello del lume. Questa tipologia di sistema si può ottenere tramite la funzionalizzazione della superficie esterna per esempio con alcuni *linker*, che vengono a loro volta utilizzati per legare la molecola di interesse. È stato visto che, funzionalizzare la superficie esterna dei nanotubi tramite l'aggiunta di sali di triazolio si è dimostrato utile per il trasporto della curcumina (Riela S. *et al.*, 2014), che in forma libera a causa della sua instabilità e della sua degradazione prematura non produce alcun effetto sulla vitalità cellulare (Anand P. *et al.*, 2007). Questo sistema infatti, oltre a dimostrare un'elevata efficienza di incapsulamento della curcumina e una capacità di rilascio controllato e prolungato nel tempo, mostra effetti citotossici contro diverse linee cellulari. La ricerca si è focalizzata anche sullo sviluppo di sistemi che permettano di somministrare in modo simultaneo più farmaci. Infatti, in ambito medico si utilizza la combinazione di due o più farmaci per migliorarne l'effetto terapeutico e per cercare di diminuire gli effetti collaterali. Tramite l'attività sinergica di due o più molecole che possiedono meccanismi d'azione differenti, si potrebbe avere una maggiore selettività nei confronti del target terapeutico. Per esempio, funzionalizzando la superficie dei nanotubi con unità ciclodestriniche, note per la loro capacità di legare molecole idrofobiche, grazie alla presenza di due diverse cavità (quella allositica e quella ciclodestrinica), si potrebbe ottenere un sistema capace di veicolare contemporaneamente

due o più molecole con caratteristiche differenti (Massaro M. *et al.*, 2014). Partendo da questo presupposto, è stato sviluppato un nuovo *nanocarrier* in cui la superficie esterna dei nanotubi è stata funzionalizzata con ciclodestrine anfifiliche, per il trasporto di due molecole, quercetina e silibinina, che possono esercitare un effetto sinergico sulle cellule tumorali. In seguito ad analisi termogravimetrica (TGA) è stato dimostrato che i nanotubi così modificati, sono capaci di accogliere entrambe le molecole.

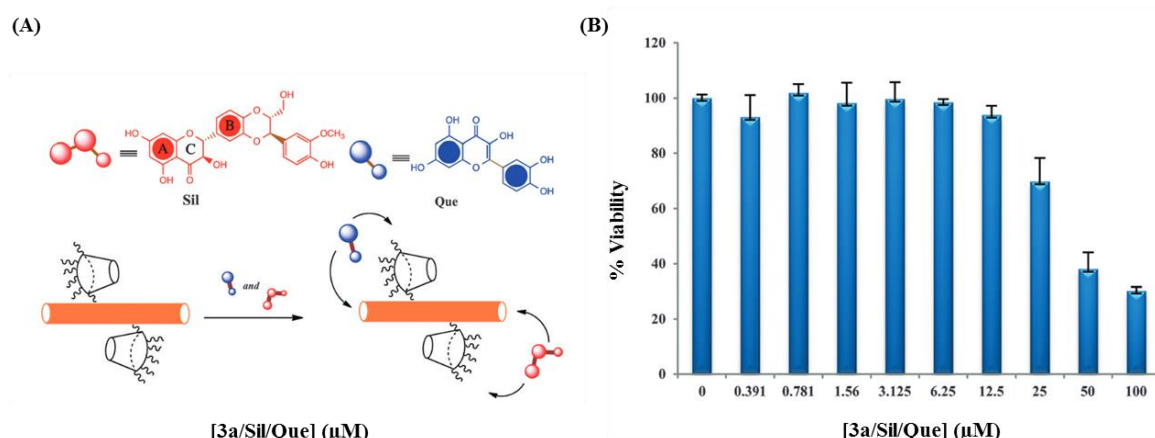
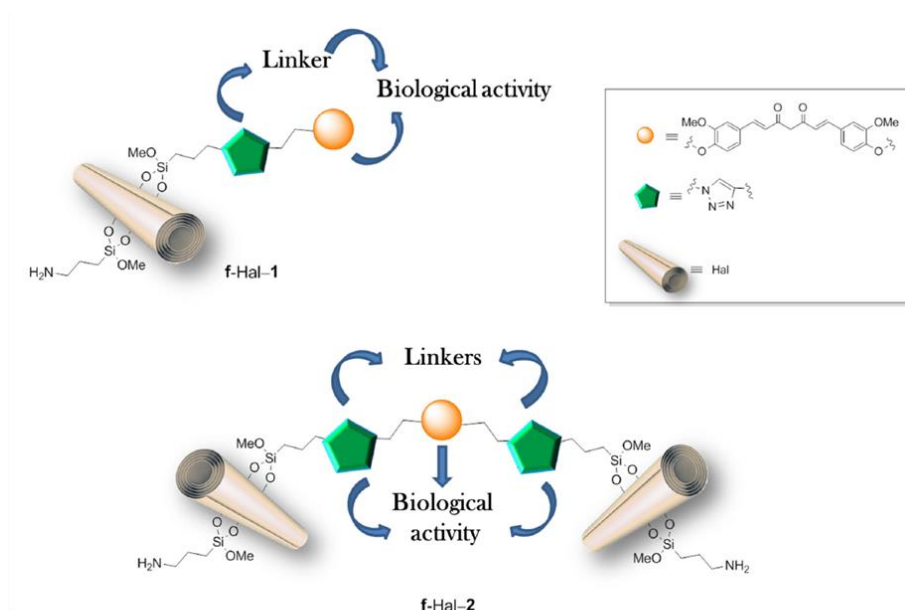


Figura 34. (A) Funzionalizzazione della superficie esterna dei nanotubi di halloysite tramite aggiunta di unità ciclodestriniche anfifiliche e caricamento con silibinina e quercetina. (B) Saggio MTS per la vitalità cellulare, condotto su cellule 8505C trattate per 72 h con diverse concentrazioni di [3a/Sil/Que] (Massaro M. *et al.*, 2014).

Inoltre indagini di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e di spettroscopia di fluorescenza hanno evidenziato che la silibinina interagisce con il lume dei nanotubi mentre la quercetina con la cavità delle unità ciclodestriniche (Figura 34 A). Saggi di citotossicità *in vitro* condotti su cellule 8505C (cellule tumorali tiroidee anaplastiche umane) hanno dimostrato l'effetto sinergico dei due farmaci nella terapia antitumorale (Figura 34 B), rivelando che il sistema sviluppato potrebbe essere un valido *carrier* di farmaci (Massaro M. *et al.*, 2015b). Massaro M. *et al.* (2020b) hanno proposto un sistema in cui sono stati utilizzati 3 derivati della curcumina e la doxorubicina, caricati rispettivamente tramite inclusione supramolecolare nel lume e tramite legame covalente sulla superficie esterna dei

nanotubi di halloysite. Sono stati valutati gli effetti citotossici del sistema così strutturato su quattro diverse linee cellulari tumorali umane: SUM-149 e MDA-MB-231 (carcinoma della mammella) e HL60 e HL60R (leucemia mieloide acuta) e i risultati ottenuti hanno mostrato una promettente attività citotossica degli ibridi (Figura 35).



IC₅₀ values of the Hal hybrid systems investigated on the different cell lines.

Entry		SUM 149 (μM)	MDA-MB-231 (μM)	HL60 (μM)	HL60 R (μM)
1	Hal/3	IC ₅₀ not reached	IC ₅₀ not reached	IC ₅₀ not reached	IC ₅₀ not reached
2	f-Hal-1	68.0 ± 15.5	75.0 ± 8.1	35.0 ± 3.5	21.0 ± 2.1
3	f-Hal-2	11.5 ± 1.8	13.0 ± 0.3	7.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0
4	f-Hal-4	24 (96 h)/20 (120h)	19 (96 h)/5 (120 h)	IC ₅₀ not reached	IC ₅₀ not reached
5	f-Hal-5	50 (96 h)/20 (120 h)	9 (96 h)/10 (120 h)	IC ₅₀ not reached	IC ₅₀ not reached
6	f-Hal-6			16	IC ₅₀ not reached
7	f-Hal-7			14.5	21.5

Figura 35. Valori di IC₅₀ dei sistemi ibridi testati su diverse linee cellulari: SUM-149, MDA-MB-231, HL60, HL60R (Massaro M. *et al.*, 2020b).

La modifica delle superfici allositiche consente la sintesi di infinite nano-architetture, che presentano proprietà diverse e che possono essere modulate in base alle prestazioni desiderate e in base al campo di applicazione. È quindi evidente il motivo che ha spinto ad approfondire la ricerca per le loro possibili applicazioni. Come dimostrato da un'indagine condotta riguardo le pubblicazioni in cui si parla di halloysite, nel periodo compreso tra il 2010 e il 2017 (basata su *Web of Science*, figura 36), è emerso che questa ha attirato in

maniera crescente l'attenzione negli ultimi anni. Si stima infatti che nel 2010, il numero di pubblicazioni riguardanti l'halloysite fosse inferiore a 100 e che meno del 50% di queste focalizzasse l'attenzione sulla tipica struttura nano-tubulare. Nel 2017 invece il numero delle pubblicazioni riguardanti l'halloysite ha subito un incremento del 400% rispetto al 2010 e più dell'85% di queste ricerche focalizzavano l'attenzione sulla caratteristica strutturale tubulare (Cheng C. *et al.*, 2020).



Figura 36. Confronto del numero annuale di pubblicazioni scientifiche sull' halloysite nel periodo di tempo compreso tra il 2010 e il 2017 (L'analisi dei dati delle pubblicazioni è stata effettuata utilizzando il sistema di ricerca Web of Science). In blu (A) è indicato il numero di pubblicazioni che riportavano il termine "halloysite"; In arancio (B) è indicato il numero di pubblicazioni che riportavano i termini "halloysite" e "nanotubo"; In grigio (C) è indicato il numero di pubblicazioni che riportavano i termini "halloysite" e "polimero" (Cheng C. *et al.*, 2020).

In figura 37 invece, è rappresentato il numero totale di pubblicazioni degli ultimi 10 anni inerenti gli studi sulle diverse possibili applicazioni dei nanotubi di halloysite, ottenuto grazie al database "Scopus". Dall'analisi, è possibile evincere che il numero di pubblicazioni riguardanti le loro possibili applicazioni in campo biomedico è in crescita e che sicuramente

aumenterà nei prossimi anni, non solo grazie alle proprietà discusse che li caratterizzano, ma soprattutto anche grazie al fatto che siano un materiale *green*, facilmente reperibile e a basso costo.

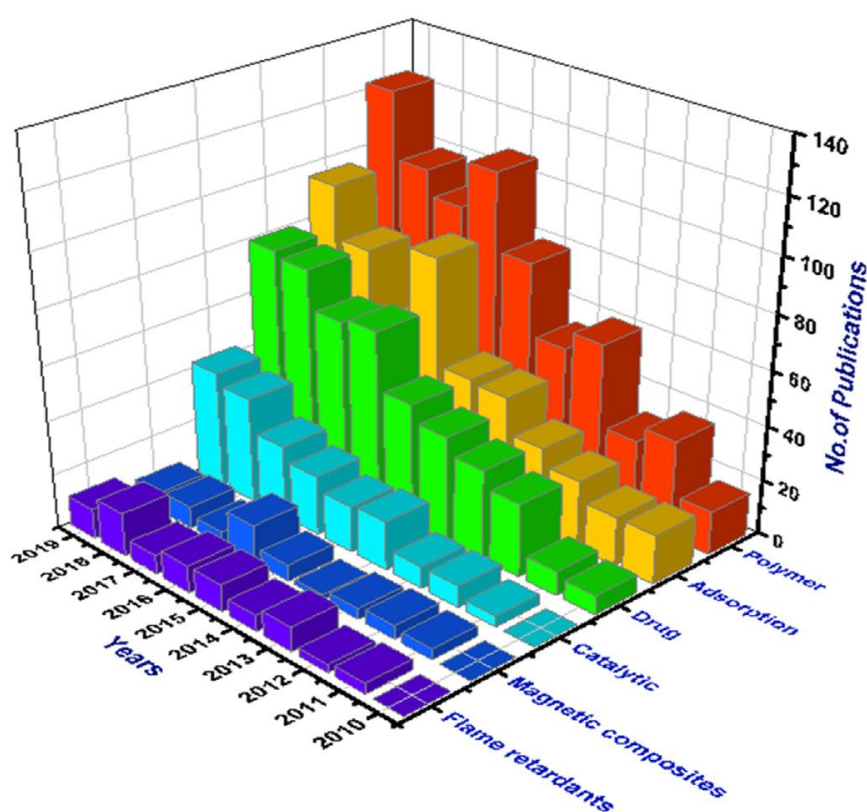


Figura 37. Numero di pubblicazioni scientifiche degli ultimi 10 anni suddivise in base alle possibili applicazioni dei nanotubi di halloysite (dati ottenuti dal database Scopus e aggiornati a febbraio 2020) (Danyliuk N. *et al.*, 2020).

Oltre ad essere un materiale molto abbondante, economico e biocompatibile, una delle caratteristiche più interessanti dei nanotubi di halloysite è la loro cavità interna nano-dimensionata, il cui diametro consente di accogliere farmaci, DNA, proteine, molecole biologicamente attive e sfruttando l'inerzia di diffusione dovuta alle strette dimensioni del lume, permette un profilo di rilascio lento e costante. Inoltre, la differente composizione delle due superfici conferisce la possibilità di sfruttare le diverse affinità di una sostanza per

un ambiente piuttosto che un altro e controllare con più selettività dove essa andrà a collocarsi sulla nano-struttura (Price R. *et al.*, 2001; Veerabadran N.G. *et al.*, 2007; Vergaro V. *et al.*, 2012; Vergara D *et al.*, 2012; Dionisi C. *et al.*, 2016; Lvov Y.M. *et al.*, 2016). Considerate le straordinarie proprietà e le molteplici applicazioni, i nanotubi di halloysite si prestano quindi ad essere degli ottimi candidati per lo sviluppo di nuovi sistemi di drug *carrier e delivery*.

Scopo della tesi

Considerando il rapido sviluppo delle nanotecnologie e la loro applicazione in svariati settori, si stima che entro la fine del 2020 circa il 20% dei prodotti fabbricati a livello mondiale, avrà fatto uso delle nanotecnologie. Un aspetto fondamentale da non sottovalutare è quello di tener conto di quali possano essere gli effetti e l'impatto derivanti dall'utilizzo delle nanotecnologie e dei nanomateriali, sull'ambiente e sulla salute umana, considerando la rapida evoluzione soprattutto relativamente all'aspetto biologico e medico. Purtroppo, da quanto emerge anche in letteratura, non è semplice valutare i possibili effetti tossici derivati dall'esposizione ai nanomateriali, in quanto le loro proprietà sono piuttosto variabili e dipendono da svariati parametri quali dimensioni, composizione chimica, carica superficiale, struttura, forma, ecc. Questo comporta che ogni tipo di nanomateriale debba essere studiato ed analizzato in prospettiva della sua applicazione, considerando le molteplici proprietà che lo caratterizzano. Presso il Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo, negli ultimi anni ci si è concentrati sulla sintesi, caratterizzazione e applicazione di nuovi nanomateriali da utilizzare nel campo del *drug carrier* (Riela S. *et al.*, 2014; Massaro M. *et al.*, 2015a; Massaro M. *et al.*, 2015b; Cavallaro G. *et al.*, 2015) e *delivery* (Massaro M. *et al.*, 2014). È in questo ambito che si sviluppa il progetto svolto durante questo percorso, con l'obiettivo di studiare le proprietà biologiche di nuovi materiali ibridi a base di nanotubi di halloysite e molecole organiche per una potenziale applicazione nel campo del *drug carrier* e *delivery*. I nanomateriali sintetizzati sono stati caratterizzati dal punto di vista fisico e morfologico, e successivamente nel corso del periodo di dottorato, sono stati valutati i loro effetti biologici e la loro biodistribuzione mediante diverse tecniche in sistemi *in vitro*. Nonostante sia noto che i nanotubi di halloysite possono attraversare la membrana plasmatica, attualmente non sono presenti molti dati riguardanti il meccanismo attraverso cui vengono internalizzati a livello cellulare. Per studiare quindi quali fossero i meccanismi cellulari coinvolti nell'*uptake* dei nanotubi di halloysite, è stato progettato un sistema in cui

i nanotubi sono stati modificati tramite inclusione supramolecolare nel lume con l'utilizzo di una sonda fluorescente per formare l'ibrido HNT/1 (Figura 38).

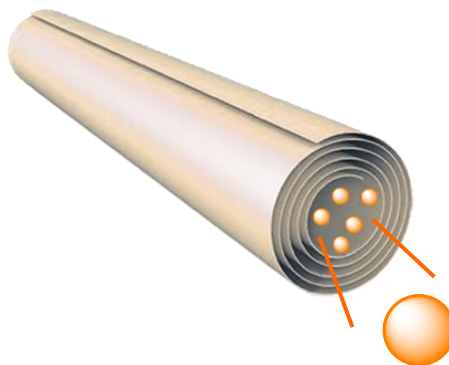


Figura 38. Sistema ibrido HNT/1.

La particolarità di questo nanocomposito è data dal fatto che la sonda utilizzata presenta una grande affinità per la cavità allositica, quindi questo sistema mima i nanotubi di halloysite “*pristine*”. Per comprendere quale fosse il meccanismo cellulare coinvolto nell'internalizzazione, sono stati effettuati dei saggi di inibizione mediante l'utilizzo di farmaci che bloccano selettivamente i diversi *pathway* coinvolti nell'*uptake*. In particolare, sono stati inibiti tutti quei processi energia-dipendenti, l'endocitosi mediata da vescicole rivestite da clatrina, la fagocitosi e l'endocitosi clatrina-indipendente, utilizzando come sistema modello due linee cellulari con caratteristiche differenti, le HeLa che sono cellule epiteliali e le Raw 264.7 che sono invece macrofagi. Considerando l'importanza che questi sistemi possono avere in campo biomedico, sono state valutate sia la citocompatibilità che l'emocompatibilità del nanocomposito, che si è rivelato altamente biocompatibile ed emocompatibile.

Poiché come anticipato prima, una delle principali applicazioni dei nanotubi di halloysite potrebbe essere quella di utilizzarli nel campo del *drug carrier*, un altro degli obiettivi è stato

di studiare le proprietà biologiche del sistema ibrido HNT/KGN costituito da nanotubi di halloysite e kartogenina (KGN). La KGN è una molecola idrofobica che promuove il differenziamento delle cellule mesenchimali staminali in condrociti, stimolando così la riparazione della cartilagine danneggiata. Essendo di natura idrofobica risulta poco stabile in un mezzo acquoso e quindi il suo utilizzo in ambito farmacologico è limitato. Questo, ha portato allo sviluppo di un nuovo sistema *carrier* per il potenziale rilascio intra-articolare di KGN, ottenuto caricando la kartogenina nel lume dei nanotubi e il composito ibrido così ottenuto è stato disperso in una matrice di idrogel di laponite (Lap), ottenendo il sistema HNT/KGN/Lap (Figura 39).

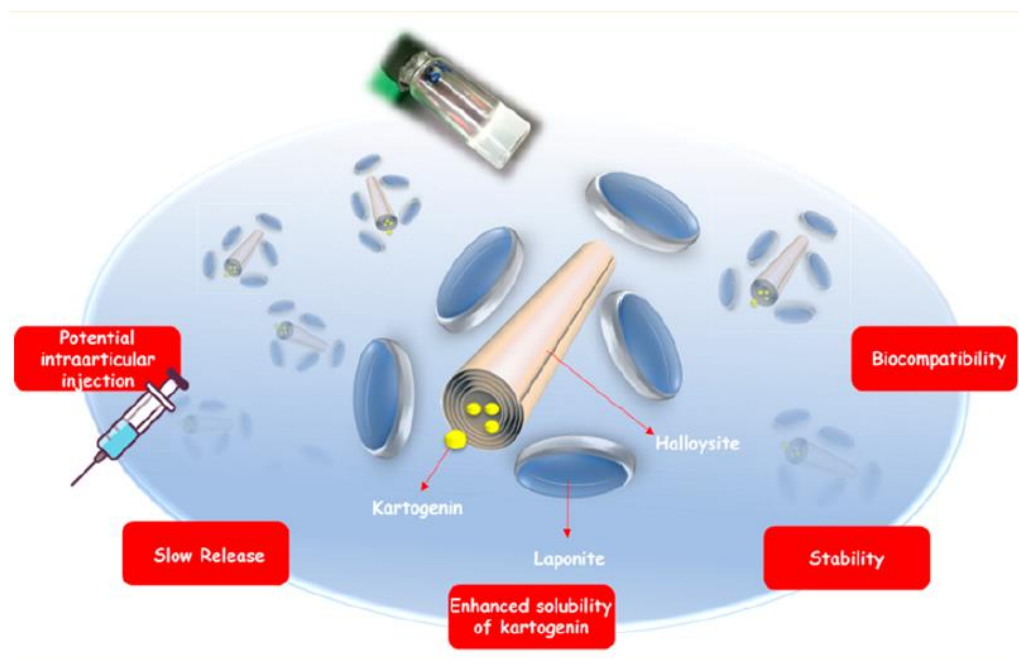


Figura 39. Sistema ibrido HNT/KGN/Lap.

La cinetica di rilascio della KGN da HNT e dal sistema HNT/KGN/Lap è stata valutata sia in condizioni fisiologiche che *ex vivo* in liquido sinoviale, dimostrando in quest'ultimo caso che la KGN può essere rilasciata in maniera costante per almeno 38 giorni (Massaro M. *et al.*, 2019a). Poiché la biocompatibilità è una caratteristica fondamentale per l'applicazione di qualsiasi nanosistema in campo biomedico, è stata valutata l'eventuale citotossicità

dell'ibrido HNT/KGN/Lap, utilizzando come sistema modello due linee cellulari: HepG2 (cellule di epatocarcinoma umane) e MC3TE-E1 (precursori osteoblasti murini).

Dopo aver stabilito i meccanismi di internalizzazione dei nanotubi di halloysite, sono state studiate le proprietà di un nuovo ibrido in cui la superficie esterna è stata funzionalizzata tramite l'aggiunta di “*carbon dots*” (CDs), con l'obiettivo di utilizzarlo come potenziale vettore non virale per la terapia genica orale. Funzionalizzare la superficie dei nanotubi con i *carbon dots*, ha permesso di conferire loro proprietà fotoluminescenti che naturalmente non possiedono. Una volta ottenuto l'ibrido HNT-CDs, (Figura 40) il passaggio successivo è stato quello studiarne le proprietà biologiche, tra le quali la citotossicità e le proprietà antiossidanti a livello cellulare.

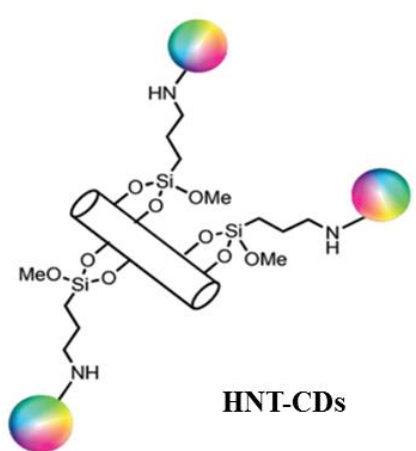


Figura 40. Sistema ibrido HNT-CDs.

Le proprietà fotoluminescenti dell'ibrido HNT-CDs, sono state valutate utilizzando sia la citofluorimetria a flusso che la microscopia a fluorescenza. Dall'analisi dei risultati è emerso che l'ibrido HNT-CDs oltre ad essere biocompatibile, presenta delle proprietà antiossidanti ed inoltre è emerso che è in grado di entrare all'interno delle cellule già dopo un breve periodo di trattamento, contrariamente a quanto succede per i nanotubi di halloysite non

modificati che impiegano circa 24 ore. La microscopia a fluorescenza ha permesso di osservare la localizzazione a livello cellulare, ed è emerso che HNT-CNDs si localizza prevalentemente nella zona perinucleare, contrariamente ai CDS liberi che si localizzano in maniera più uniforme a livello citoplasmatico (Massaro M. *et al.*, 2019b).

Risultati

3.1 Sistema ibrido HNT/1

Nonostante sia ormai noto che i nanotubi di halloysite possono attraversare la membrana plasmatica ed entrare nelle cellule, attualmente non è ancora ben stabilito l'esatto meccanismo mediante il quale vengono internalizzati a livello cellulare. Si suppone che, come avviene per i nanotubi di carbonio (CNTs) che sono molto simili dal punto di vista morfologico, possano attraversare la membrana per diffusione passiva o secondo quello che viene definito meccanismo “*needle-like*” (come un ago) (Al-Jamal K.T. *et al.*, 2011). Poiché una delle principali applicazioni dei HNT in ambito biomedico potrebbe essere quella di utilizzarli come sistemi di *drug carrier* e *delivery*, è essenziale comprendere meglio quali possano essere i meccanismi coinvolti nell'internalizzazione a livello cellulare. Sfortunatamente però i nanotubi di halloysite, non presentano proprietà fotoluminescenti e questo rende molto difficile seguirne il loro percorso. Al fine di studiare i meccanismi coinvolti nell'*uptake* cellulare, è stato sintetizzato il sistema ibrido HNT/1 secondo lo schema mostrato in figura 41, in cui il lume dei nanotubi di halloysite è stato modificato tramite inclusione supramolecolare con la sonda fluorescente Curcumina-Bodipy (sintetizzata presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali dell'Università degli Studi di Messina) e in cui la percentuale di caricamento della porzione organica è risultata essere pari al 4%. La curcumina presenta una caratteristica fluorescenza verde, che in questo caso viene accentuata poiché è stata modificata con l'aggiunta di Bodipy, un colorante verde fluorescente con eccitazione ed emissione simili alla fluoresceina (FITC). Questa sonda, presenta una grande affinità per il lume dei nanotubi e quindi l'ibrido HNT/1 mima i nanotubi di halloysite “*pristine*” (non modificati), poiché la superficie esterna non presenta alcun tipo di funzionalizzazione. Questo, ha permesso di studiare l'interazione con la membrana plasmatica senza alcuna influenza che poteva essere data dall'aggiunta di gruppi funzionali sulla superficie esterna.

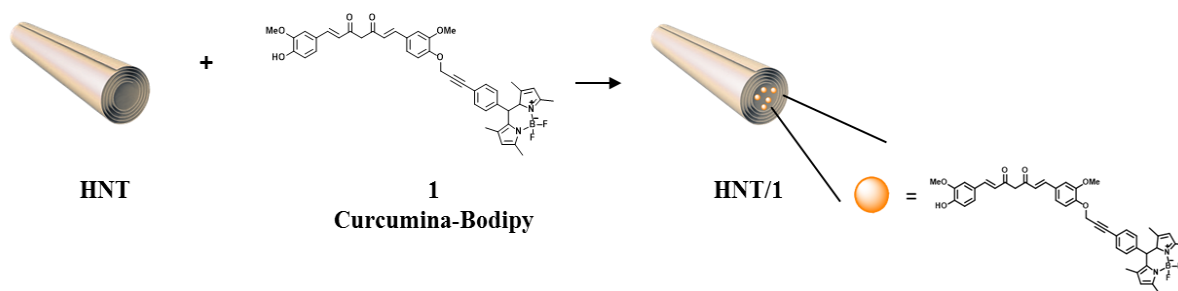


Figura 41. Rappresentazione del sistema ibrido HNT/1.

In seguito allo studio della cinetica di rilascio della Curcumina-Bodipy dal lume dei nanotubi, a diversi intervalli di tempo in tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4, è emerso che dopo circa 8 h la percentuale di rilascio è pari al 4,6% e che questa si mantiene costante a distanza di 24 h (Figura 42).

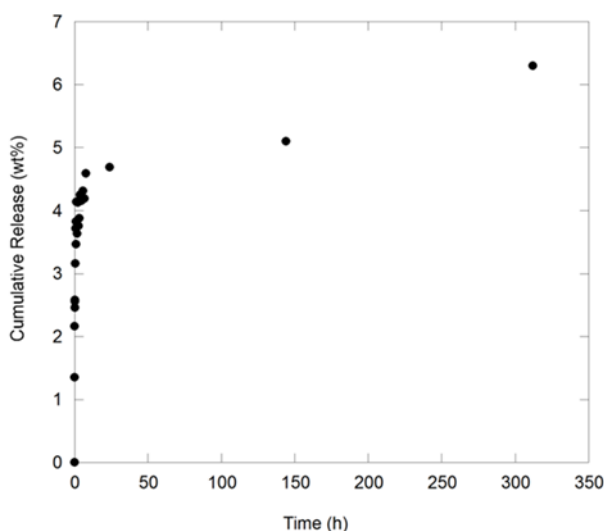


Figura 42. Cinetica di rilascio della sonda Curcumina-Bodipy dal lume dei nanotubi di halloysite in PBS 1X pH 7.4.

3.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT/1

Considerando che la biocompatibilità è tra le proprietà essenziali di un sistema di trasporto ideale, prima di studiare i meccanismi coinvolti nell'*uptake* cellulare sono stati valutati *in vitro*, tramite saggio di vitalità cellulare, gli eventuali effetti citotossici dell'ibrido HNT/1. Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate come sistema modello due linee cellulari con

caratteristiche differenti, ovvero cellule HeLa (cellule epiteliali umane isolate da carcinoma della cervice uterina) e Raw 264.7 (macrofagi murini). La vitalità cellulare è stata determinata in seguito ad incubazione con diverse concentrazioni di HNT/1 come illustrato per le cellule HeLa e Raw 264.7, rispettivamente in figura 43 e 44. I risultati dimostrano che questo nuovo nanomateriale, così come i nanotubi di halloysite *pristine*, mostra una bassa citotossicità. Infatti, dopo un trattamento di 24 ore, la vitalità cellulare è prossima all'80% per la più alta concentrazione di HNT/1 in cellule HeLa e vicina al 100% in Raw 264.7. Possiamo quindi affermare che HNT/1, mostra una bassa citotossicità nei confronti di entrambe le linee cellulari.

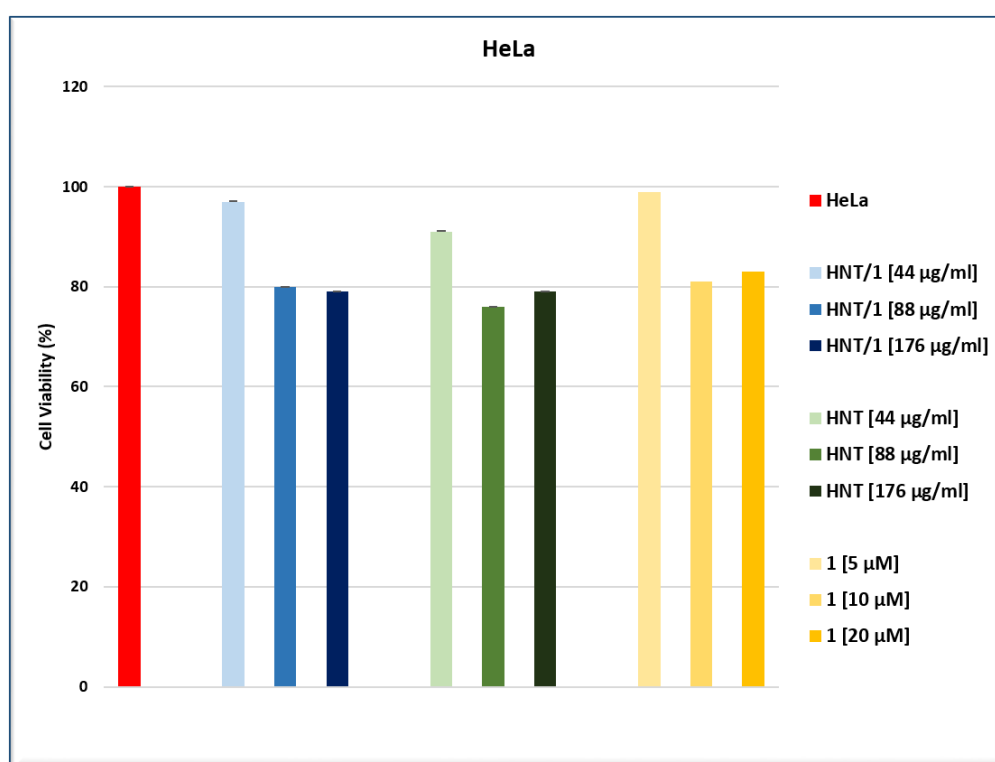


Figura 43. Saggio di vitalità cellulare eseguito su cellule HeLa in seguito ad un trattamento di 24 h con concentrazioni crescenti del composto HNT/1 comprese tra 44 µg/ml e 176 µg/ml.

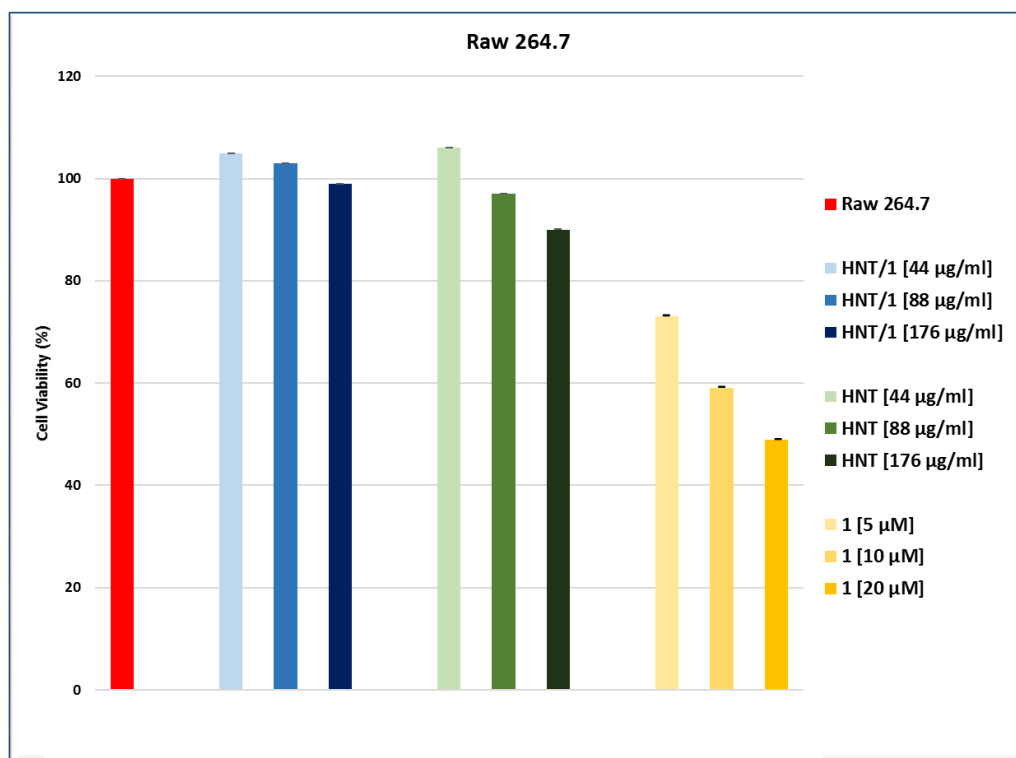


Figura 44. Saggio di vitalità cellulare eseguito su cellule Raw 264.7 in seguito ad un trattamento di 24 h con concentrazioni crescenti del composto HNT/1 comprese tra 44 µg/ml e 176 µg/ml.

3.3 Uptake dell'ibrido HNT/1

Come noto, la membrana cellulare è una sottile membrana semipermeabile che protegge tutti i componenti intracellulari dall'ambiente circostante. Questa è quindi coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, funge da supporto strutturale per la cellula e aiuta a mantenerne la forma. Inoltre, mantiene i gradienti di concentrazione e controlla l'entrata e l'uscita di nutrienti e piccole molecole (Watson H., 2015; Ernst R. *et al.*, 2018). L'ingresso attraverso la membrana cellulare può avvenire per diffusione passiva o attraverso altri meccanismi, ad esempio attraverso canali, recettori o trasportatori (Dutta D. *et al.*, 2012). Attualmente, sono stati individuati diversi meccanismi attraverso i quali le nanoparticelle possono entrare all'interno delle cellule e tra questi ci sono i vari processi endocitici energia dipendenti. Questi racchiudono le nanoparticelle in piccole vescicole di membrana, ovvero gli endosomi. L'endocitosi può essere classificata in due categorie: fagocitosi e pinocitosi

(Conner S.D. *et al.*, 2003). La fagocitosi è un processo che si verifica in cellule specializzate come fagociti mononucleati, neutrofili e macrofagi. In queste cellule, l'internalizzazione delle particelle consiste principalmente nell'interazione, riconoscimento e ingestione da parte di una vescicola derivata dalla membrana plasmatica, detta fagosoma (Allen L.A. *et al.*, 1996; Aderem A. *et al.*, 1999; Groves E. *et al.*, 2008). La pinocitosi invece può essere suddivisa in micropinocitosi, endocitosi clatrina dipendente (CDE) ed endocitosi indipendente da clatrina (CIE) (Howes M.T. *et al.*, 2010; Vercauteren D. *et al.*, 2010; McMahon H.T. *et al.*, 2011). Al fine di identificare la via di internalizzazione di HNT/1, sono stati utilizzati farmaci differenti per inibire in maniera selettiva i diversi processi endocitici, ovvero *Sodium azide* (NaN_3) *Chlorpromazine hydrochloride*, *Cytochalasin D* e *Nocodazole*. Nello specifico, la *Sodium azide* è stata utilizzata poiché interferendo con il complesso IV della catena di trasporto degli elettroni induce una deplezione della sintesi di ATP, andando quindi ad interferire in generale con tutti i processi energia dipendenti (Tsubaki M. *et al.*, 1993; Gribble F.M. *et al.*, 1997; Harvey J. *et al.*, 1999; Kostarelos K. *et al.*, 2007). La *Chlorpromazine hydrochloride* interferisce con i processi di endocitosi mediati da vescicole rivestite da clatrina (Wang L.H. *et al.*, 1993; Vercauteren D. *et al.*, 2010; Dombu C.Y. *et al.*, 2010; McMahon H.T. *et al.*, 2011). Il *Nocodazole* invece interferisce, legandosi alla tubulina, con la polimerizzazione dei microtubuli (Hoebeke J. *et al.*, 1976) che oltre a controllare il traffico intracellulare delle vescicole (Cole N.B. *et al.*, 1995) sono anche coinvolti nell'endocitosi mediata da clatrina (Subtil A. *et al.*, 1997). Ed infine la *Cytochalasin D*, che inducendo la depolimerizzazione dei filamenti di actina (Schliwa M., 1982) può essere utilizzata per inibire la fagocitosi e l'endocitosi clatrina-indipendente (Cooper J.A., 1987; Mayor S. *et al.*, 2007). Poiché questi farmaci a seconda della linea cellulare e delle concentrazioni utilizzate possono rivelarsi più o meno tossici per le cellule, prima di procedere con gli studi di internalizzazione è stata testata la citotossicità per le concentrazioni di riferimento da testare. Entrambe le linee cellulari sono state trattate con differenti concentrazioni dei vari inibitori per 2h 30' e prima di procedere

con i saggi di vitalità cellulare sono state osservate al microscopio per valutare possibili cambiamenti nella morfologia, in risposta al trattamento con questi farmaci. Come è possibile osservare in figura 45 B e in figura 46 B, in seguito al trattamento con i farmaci inibitori vi è un'alterazione della morfologia cellulare ma, nonostante ciò, il test MTS (figura 45 A e 46 A) conferma che le cellule sono ancora vitali (ad eccezione della condizione in cui sono state trattate con la più alta concentrazione di *Chlorpromazine hydrochloride*). Alla luce di questi risultati, e dei dati presenti in letteratura, è stata stabilita la concentrazione ottimale di farmaci da utilizzare per gli studi di inibizione. Per *Cytochalasin D* e *Nocodazole* [10µM], per *Chlorpromazine H* [10 µg/ml] e per *Sodium azide* 0,005%.

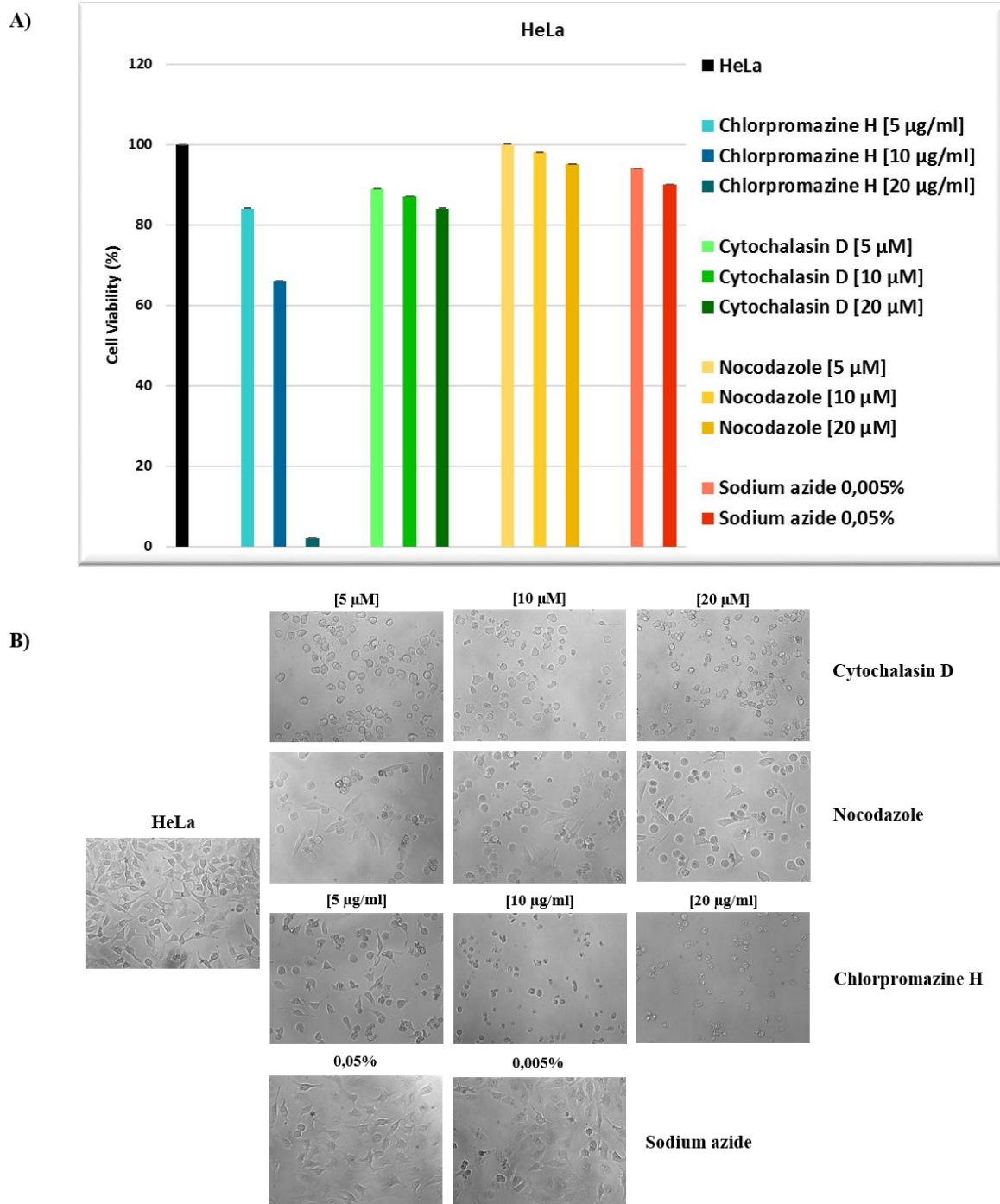


Figura 45. (A) Saggio di vitalità cellulare eseguito su cellule HeLa dopo un trattamento di 2h 30' con diverse concentrazioni dei farmaci inibitori. (B) Immagini al microscopio di cellule HeLa dopo trattamento di 2h 30' con diverse concentrazioni dei farmaci inibitori.

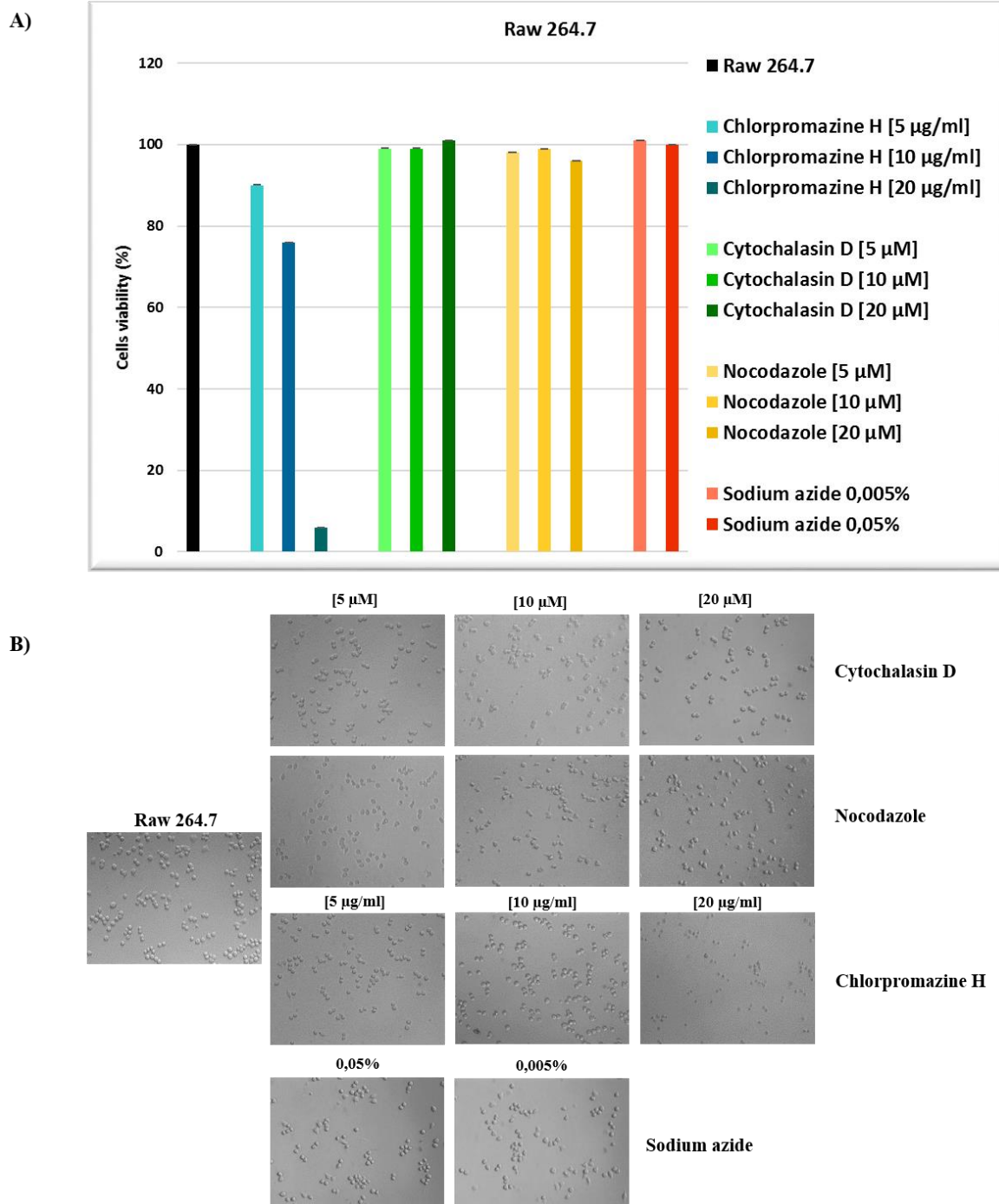


Figura 46. (A) Saggio di vitalità cellulare eseguito su cellule Raw 264.7 in seguito ad un trattamento di 2h 30' con diverse concentrazioni dei farmaci inibitori. (B) Immagini al microscopio di cellule Raw 264.7 dopo trattamento di 2h 30' con diverse concentrazioni dei farmaci inibitori.

Valutata la biocompatibilità di HNT/1 e le concentrazioni di farmaci da utilizzare per i saggi di inibizione, è stato verificato tramite microscopia a fluorescenza che l'ibrido HNT/1 fosse in grado di entrare dentro le cellule. Le cellule HeLa sono state trattate per 24 h con diverse concentrazioni di HNT/1, mentre le cellule Raw 264.7 essendo dei macrofagi, sono state sottoposte ad un trattamento di 4 h. Infatti, è noto in letteratura che i macrofagi sono in grado di degradare l'halloysite (Massaro M. *et al.*, 2017). Per quanto riguarda le prime, dai dati di microscopia a fluorescenza è emerso che HNT/1 è in grado di entrare all'interno delle cellule e di localizzarsi a livello della zona perinucleare (Figura 47) (dato confermato sia a 4 h che a 24 h dal trattamento).

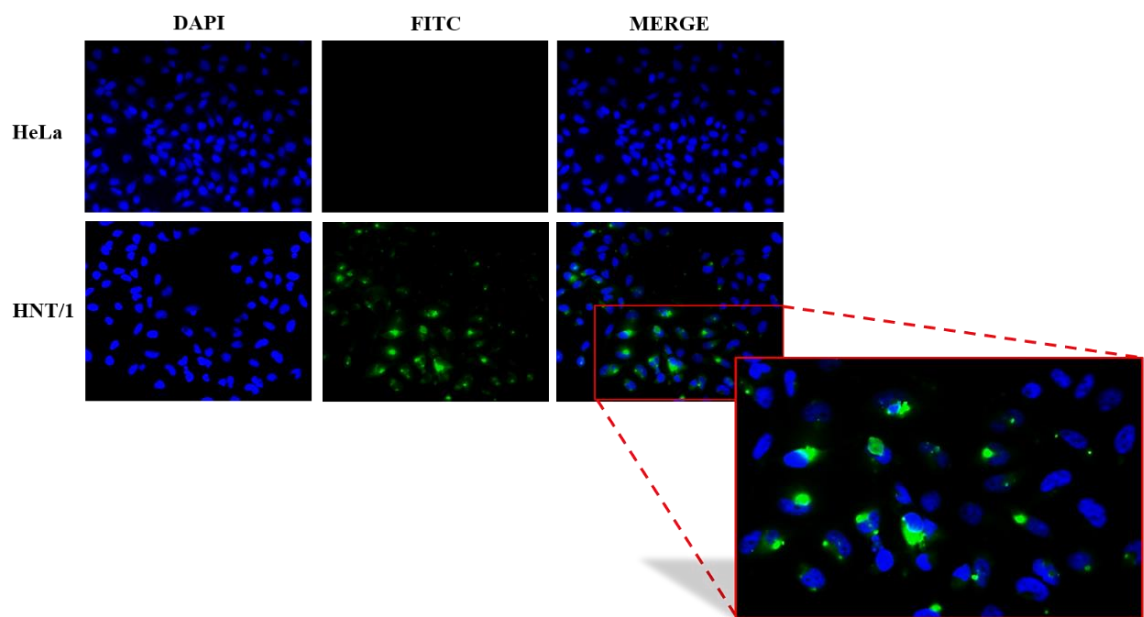


Figura 47. Immagini di microscopia a fluorescenza. Cellule HeLa trattate per 24 h con il composito HNT/1 ad una concentrazione pari a [88 µg/ml]. In blu (DAPI) evidenziati i nuclei, in verde (FITC) HNT/1 che si dispone a livello perinucleare. Ingrandimento 20X.

Anche in cellule Raw 264.7, con un periodo di incubazione con HNT/1 pari a 4 h è stato possibile osservare il segnale fluorescente verde a livello della zona perinucleare (Figura 48).

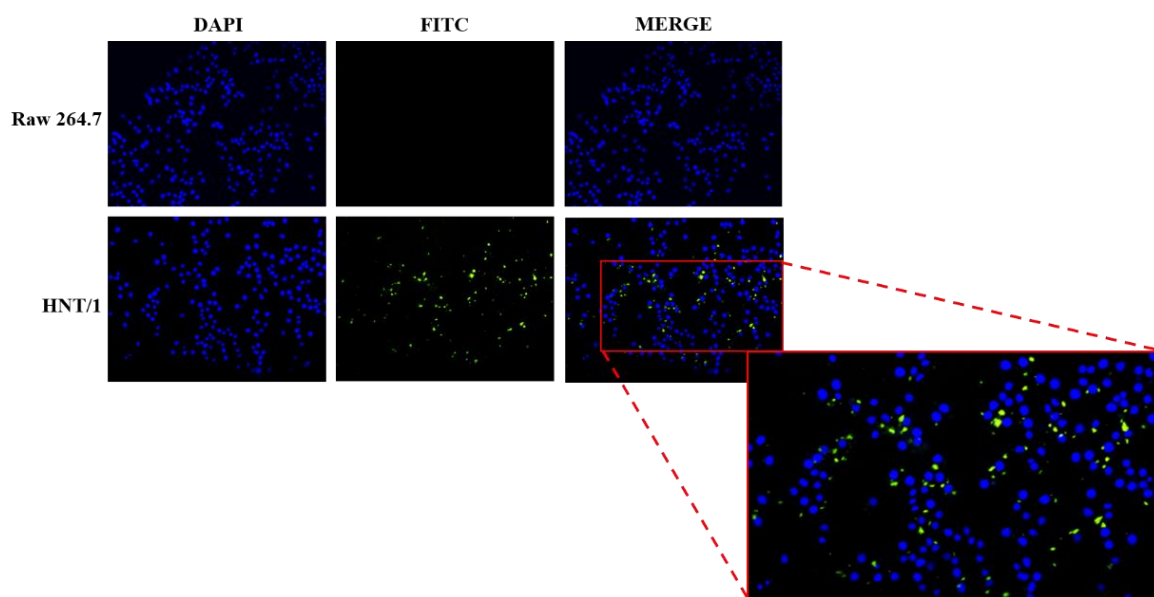


Figura 48. Immagini di microscopia a fluorescenza. Cellule Raw 264.7 trattate per 4 h con il composito HNT/1 ad una concentrazione pari a [88 $\mu\text{g/ml}$]. In blu (DAPI) evidenziati i nuclei, in verde (FITC) HNT/1 che si dispone a livello perinucleare. Ingrandimento 20X.

In figura 49, è possibile osservare cellule HeLa trattate per 24 h con HNT/1 ad una concentrazione pari a [88 $\mu\text{g/ml}$] dopo un pre-trattamento di 2 h 30' con i diversi inibitori alle concentrazioni indicate. Dai risultati si evince che in cellule HeLa pretrattate con *Sodium azide* (NaN_3) (Figura 49 D), *Cytochalasin D* (Figura 49 E) e *Chlorpromazine H* (Figura 49 F), si ha una notevole riduzione del segnale FITC all'interno delle cellule, correlato a una diminuzione della presenza di HNT/1 rispetto alla condizione in cui le cellule non sono state pretrattate con gli inibitori (Figura 49 C). In figura 49 B, come controllo, le cellule sono state trattate con HNTs *pristine* e non è possibile rilevare alcun segnale di fluorescenza nel verde. Anche in cellule Raw 264.7 (Figura 50) pretrattate con *Sodium azide* (NaN_3) (Figura 50 D), *Cytochalasin D* (Figura 50 E), *Chlorpromazine H* (Figura 50 F) e *Nocodazole* c'è una diminuzione del segnale FITC, dovuto ad una riduzione nell'internalizzazione di HNT/1. In figura 50 C, la condizione in cui le cellule non sono state pretrattate con gli inibitori, si nota una maggiore presenza di HNT/1. Anche in questo caso, come controllo, le cellule sono state

trattate solo con HNT *pristine* alla concentrazione indicata (Figura 50 B), come mostrato non è possibile rilevare alcun segnale di fluorescenza nel verde.

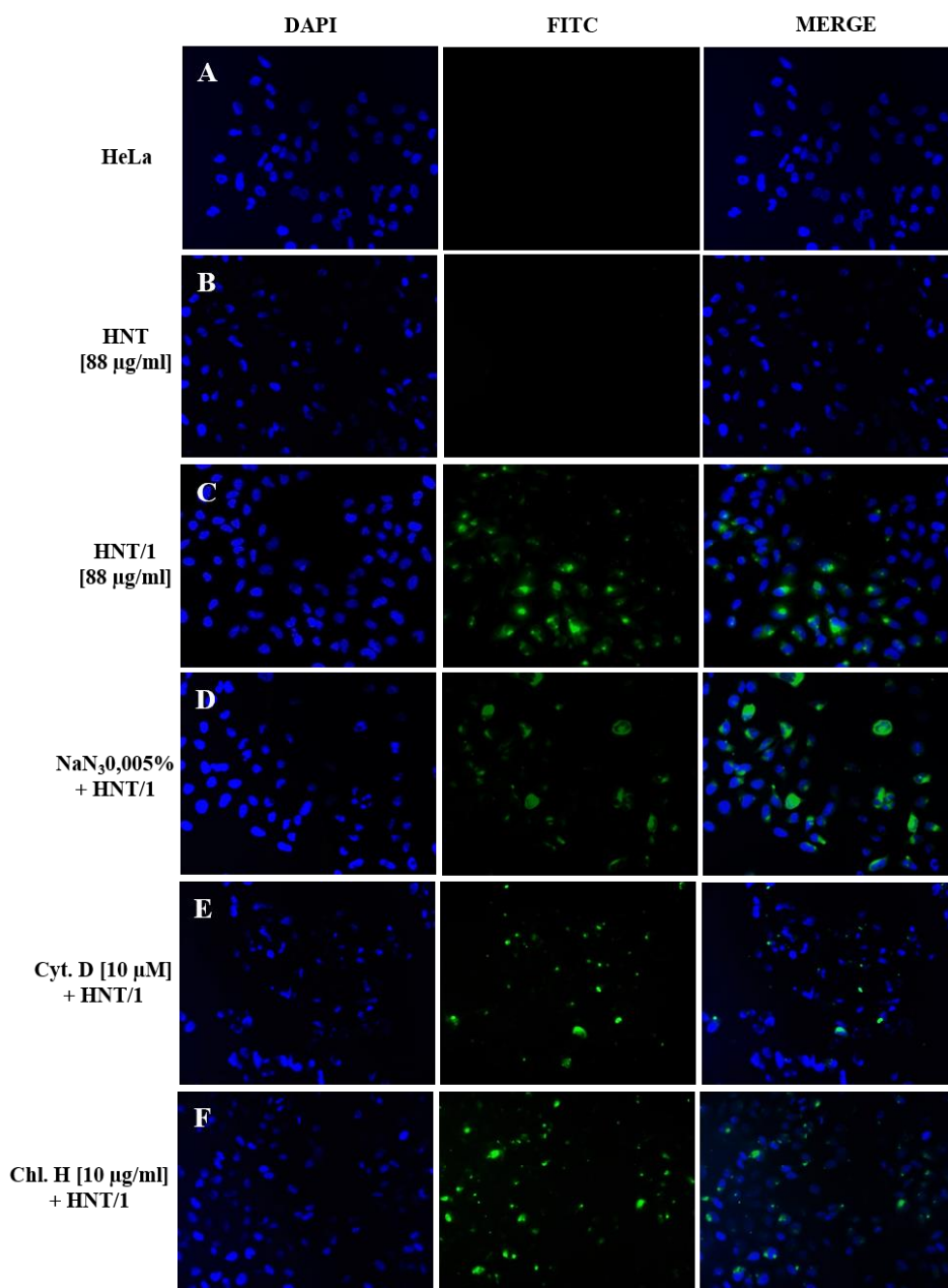


Figura 49. Inibizione dell'internalizzazione di HNT/1 in cellule HeLa. (A) Cellule HeLa non trattate; (B) Cellule HeLa trattate per 24 h con HNT *pristine* ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (C) Cellule HeLa trattate per 24 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (D) Cellule HeLa pretrattate per 2 h 30' con NaN₃ 0,005% e incubate successivamente per 24 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (E) Cellule HeLa pretrattate per 2 h 30' con Cyt.D [10 µM] e incubate successivamente per 24 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (F) Cellule HeLa pretrattate per 2 h 30' con Chl. H [10 µg/ml] e incubate successivamente per 24 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]. In blu (DAPI) evidenziati i nuclei, in verde (FITC) HNT/1, MERGE sovrapposizione DAPI e FITC. Ingrandimento 20X.

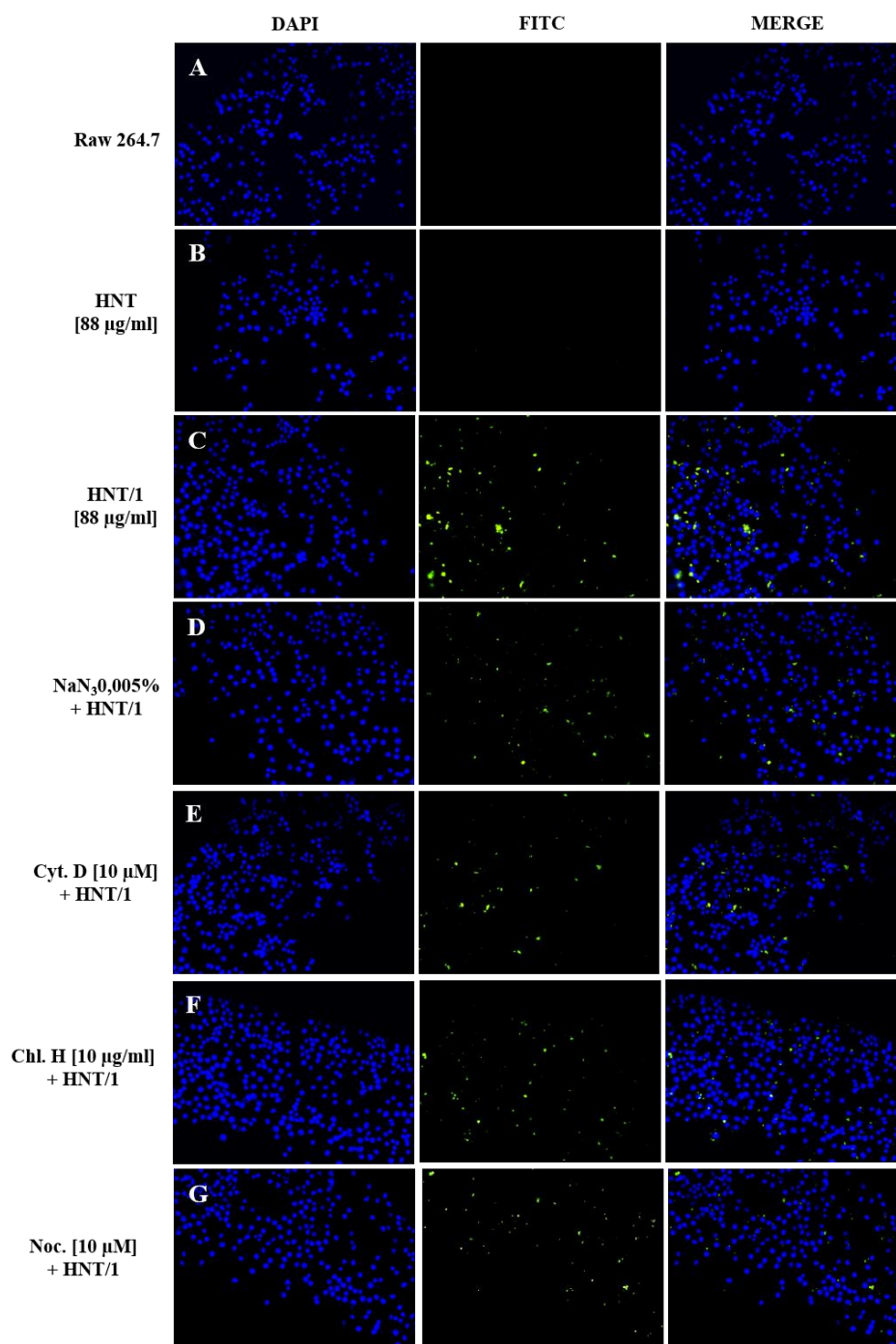


Figura 50. Inibizione dell'internalizzazione di HNT/1 in cellule Raw 264.7. (A) Cellule Raw 264.7 non trattate; (B) Cellule Raw 264.7 trattate per 4 h con HNT non modificati ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (C) Cellule Raw 264.7 trattate per 4 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (D) Cellule Raw 264.7 pretrattate per 2 h 30' con NaN₃ 0,005% e incubate successivamente per 4 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (E) Cellule Raw 264.7 pretrattate per 2 h 30' con Cyt.D [10 µM] e incubate successivamente per 4 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (F) Cellule Raw 264.7 pretrattate per 2 h 30' con Chl. H [10 µg/ml] e incubate successivamente per 4 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]; (G) Cellule Raw 264.7 pretrattate per 2 h 30' con Noc. [10 µM] e incubate successivamente per 4 h con HNT/1 ad una concentrazione di [88 µg/ml]. In blu (DAPI) evidenziati i nuclei, in verde (FITC) HNT/1, MERGE sovrapposizione DAPI e FITC. Ingrandimento 20X.

Per analizzare il numero di nanoparticelle internalizzate per ciascuna condizione, è stato utilizzato il software “ImageJ”, che ci ha permesso di quantizzare la fluorescenza data dall’internalizzazione di HNT/1 nelle cellule in seguito ai trattamenti con i vari farmaci inibitori, rispetto al controllo. Per ogni condizione sono stati analizzati sei campi differenti con un numero di cellule paragonabili e sono state quantificate le particelle fluorescenti per ciascun nucleo. Come è possibile osservare in figura 51, gli istogrammi contrassegnati con (*), indicano che c’è una differenza statisticamente significativa ($p < 0,01$) nel segnale fluorescente dato da HNT/1 tra le cellule non pre-trattate con gli inibitori e quelle sottoposte a pre-trattamento.

PATHWAYS INIBITI	INIBITORI	TARGET
Endocitosi	<i>Chlorpromazine H</i>	Endocitosi mediata da clatrina (CME)
Endocitosi e Fagocitosi	<i>Cythocalasin D</i>	Depolimerizzazione filamenti di actina, inibisce endocitosi clatrina-indipendente (CIE) e fagocitosi
Endocitosi	<i>Nocodazole</i>	Depolimerizzazione microtubuli
Endocitosi ATP-dipendente	<i>Sodium azide (NaN₃)</i>	Inibisce produzione di ATP

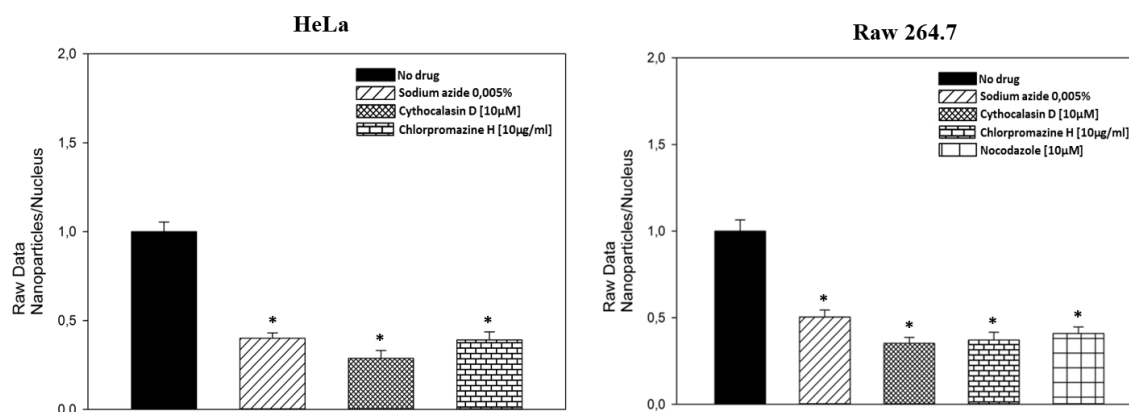


Figura 51. Analisi quantitativa dell’*uptake* cellulare di HNT/1 in presenza di vari inibitori. In (A) cellule HeLa pretrattate per 2h 30’ con i vari inibitori e incubate per 24 h con HNT/1; (B) Cellule Raw 264.7 pretrattate per 2h 30’ con i vari inibitori e incubate per 4 h con HNT/1. (*) $p < 0,01$

Dall’analisi dei risultati è emerso che, sia nelle cellule epiteliali che nei macrofagi, i processi coinvolti nell’internalizzazione sono in parte energia dipendenti. Infatti, dopo il pre-

trattamento con *Sodium azide*, che induce una deplezione dei livelli di ATP interferendo con la catena di trasporto degli elettroni, si ha una riduzione dell'internalizzazione di circa il 50% per entrambe le linee cellulari. Per quanto riguarda le cellule HeLa (Figura 51 A) è evidente anche che la *Chlorpromazine H* e la *Cytochalasin D* sono in grado di inibire rispettivamente l'endocitosi mediata da clatrina e l'endocitosi indipendente da clatrina/caveolina. Anche nelle celle Raw 264.7 (Figura 51 B), la presenza degli inibitori riduce l'assorbimento cellulare di HNT/1. In particolare, in questa linea cellulare il trattamento con *Nocodazole* ha portato ad una riduzione dell'assorbimento cellulare di HNT/1, indicando che anche i microtubuli partecipano al traffico cellulare del sistema ibrido. In generale, il meccanismo di internalizzazione delle nanoparticelle può variare in base alle loro proprietà e quindi in base alle dimensioni, alla carica superficiale e alla composizione. Il tipo di endocitosi coinvolta nell'internalizzazione dipende principalmente dalle dimensioni delle nanoparticelle. L'eterogeneità delle dimensioni dei nanotubi di halloysite quindi potrebbe essere una spiegazione del coinvolgimento dei diversi *pathways* endocitici (Kam N.W.S. *et al.*, 2006; Hillaireau H. *et al.*, 2009).

3.4 Emocompatibilità dell'ibrido HNT/1

L'utilizzo dei nanomateriali per applicazioni in campo biomedico, prevede che questi inducano in seguito al contatto i globuli rossi (RBCs), una percentuale di emolisi che sia inferiore o uguale al 5% (Liu H.Y. *et al.*, 2015). Per valutare l'emocompatibilità, e quindi la stabilità dei globuli rossi a contatto con HNT/1, è stato utilizzato sangue umano proveniente da 12 soggetti (6 donne e 6 uomini) sani. Da ciascun campione sono stati isolati i globuli rossi e questi sono stati posti a contatto con diverse concentrazioni di HNT/1 per 24 ore a 37 °C. L'effetto emolizzante è stato valutato leggendo i valori di assorbanza a 570 nm del sopranatante. A concentrazioni elevate di HNT/1, pari a [200 µg/ml], la percentuale di emolisi indotta dal contatto con il nanomateriale rimane inferiore al 5%, rendendo possibile

classificare quindi HNT/1 come composto non emolizzante. Osservando i risultati (Figura 52) è evidente che esiste una differenza significativa nei valori di assorbanza a 570 nm (associata al danno alla membrana dei globuli rossi e al rilascio di emoglobina) tra il controllo positivo (RBC esposti all'acqua) e le condizioni trattate con differenti concentrazioni di HNT/1.

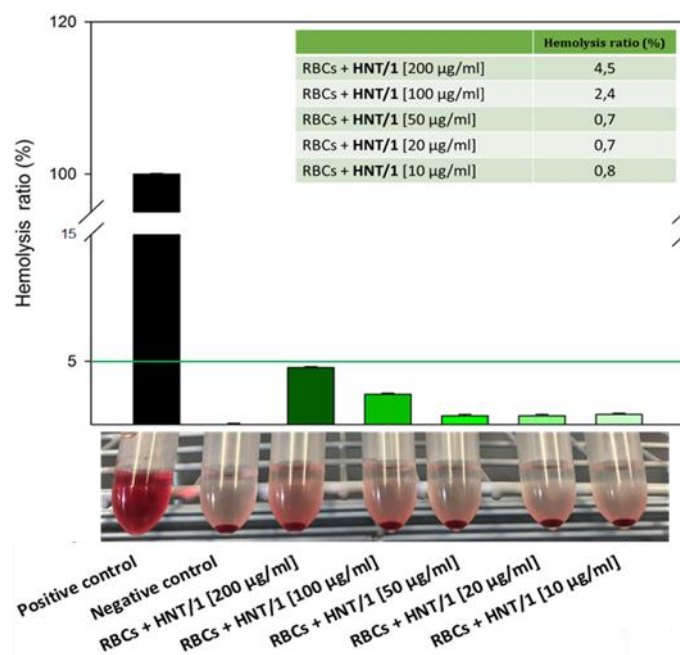


Figura 52. Saggio di emocompatibilità *in vitro*. RBCs incubati per 24 h a 37 °C con diverse concentrazioni di HNT/1. Controllo positivo (100% emolisi) in acqua ultra pura. Controllo negativo PBS 1X pH 7.4.

I meccanismi di internalizzazione cellulare di HNT/1 sono stati studiati in cellule HeLa e Raw 264.7, due linee cellulari con caratteristiche differenti, con l'obiettivo di valutare se il tipo cellulare potesse influenzare o meno il meccanismo di *uptake*. Sulla base delle informazioni ottenute mediante microscopia a fluorescenza, è chiaro che HNT/1 può entrare all'interno delle cellule e disporsi prevalentemente a livello perinucleare, sia in cellule epiteliali che macrofagi. Il trasporto di HNT/1 all'interno della cellula, inizia probabilmente con un'interazione con la membrana cellulare e continua poi con l'internalizzazione energia dipendente in entrambe le linee cellulari. In particolare, in cellule HeLa sembrano essere

coinvolte endocitosi clatrina dipendente e indipendente. Nelle cellule Raw 264.7, oltre alla fagocitosi e all'endocitosi clatrina dipendente e indipendente, anche i microtubuli sembrano partecipare al traffico cellulare di HNT/1. Sembra quindi esistere una combinazione di diversi meccanismi endocitici, che sono coinvolti nell'*uptake* di HNT/1 sia in cellule epiteliali che nei macrofagi. L'eterogeneità delle dimensioni dei nanotubi, potrebbe essere la ragione per cui l'internalizzazione è mediata da meccanismi differenti. La comprensione delle vie di trasporto cellulare dei HNT può aiutare nella progettazione razionale di nuovi sistemi di somministrazione di farmaci e può essere di grande valore per le loro applicazioni in campo biomedico.

4.1 Sistema ibrido HNT/KGN/Lap

L'osteoartrite (OA) è una malattia degenerativa delle articolazioni contraddistinta da una graduale degradazione della cartilagine che si verifica in associazione ad una infiammazione della membrana sinoviale, sclerosi ossea subcondrale e formazione di osteofiti. I sintomi che la caratterizzano sono dolore, disfunzione articolare e gonfiore, con conseguente disabilità e qualità della vita notevolmente ridotta (Charlier E. *et al.*, 2019). Johnson *et al.* (2012), hanno presentato dei dati a supporto dell'utilizzo della kartogenina (KGN), una piccola molecola eterociclica, in cui mostrano che se somministrata tramite iniezioni intra-articolari induce il differenziamento delle cellule mesenchimali staminali (MSCs) in condrociti, responsabili della produzione di cartilagine. Come mostrato in figura 53, la kartogenina si lega all'estremità carbossilica della filamina A, CBF β viene così rilasciato e può traslocare nel nucleo, dove si lega al fattore di trascrizione RUNX1. Il complesso CBF β –RUNX1, attiva così la trascrizione dei geni coinvolti nella condrogenesi.

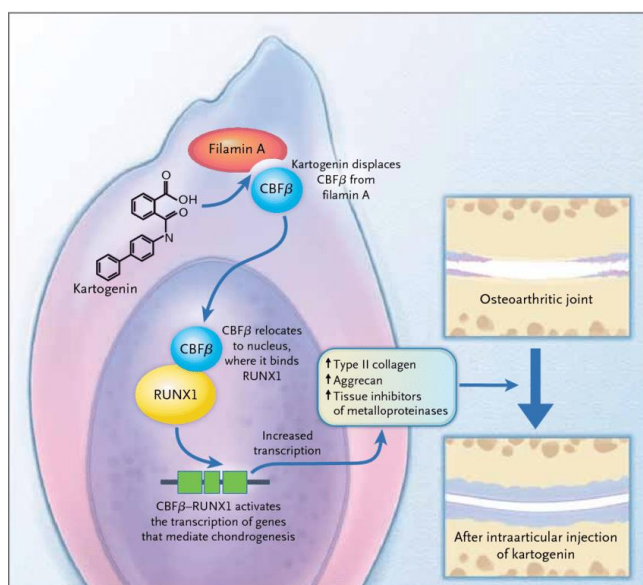


Figura 53. La kartogenina (KGN) induce il rilascio di CBF β da parte della Filamina A. CBF β può quindi traslocare nel nucleo e interagire con RUNX1, portando alla trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi di collagene di tipo II, aggrecano e inibitori tissutali delle metalloproteasi, proteggendo la cartilagine dai fattori di stress (Marini J.C. *et al.* 2012).

La kartogenina però è una molecola idrofobica e non è molto stabile in un mezzo acquoso, questo limita quindi il suo utilizzo per applicazioni farmacologiche. Uno degli approcci terapeutici per la cura dell'osteoartrite potrebbe essere quello di utilizzare delle iniezioni intra-articolari (Gerwin N. *et al.*, 2006; Iannitti T. *et al.*, 2011). La somministrazione di una dose elevata di kartogenina attraverso questa via, per ottenere un rilascio prolungato nel tempo potrebbe rappresentare un trattamento efficace. Questo ridurrebbe i possibili effetti collaterali dovuti ad una somministrazione per via sistemica, ed eviterebbe soprattutto l'inconveniente di doversi sottoporre frequentemente alle iniezioni (Im G. I., 2018; Maudens P. *et al.*, 2018). Tenendo in considerazione le proprietà dei nanotubi di halloysite e quanto appena discusso, è stato progettato un sistema per il potenziale rilascio della kartogenina tramite iniezione intra-articolare (Massaro M. *et al.*, 2019b). In particolare il sistema progettato (HNT/KGN/Lap), consiste in un idrogel a base di laponite, un'argilla che ha la caratteristica di formare in ambiente acquoso dei gel tixotropici che possono essere iniettati con aghi 21G (Boyer C. *et al.*, 2018), nanotubi di halloysite e kartogenina. Quest'ultima è stata caricata nel lume dei nanotubi di halloysite *pristine* (non modificati) ottenendo una efficienza di intrappolamento pari al 99,4% ed una percentuale di caricamento pari al 6% in peso (60 mg g^{-1}). I nanotubi così ottenuti, sono stati poi utilizzati come filler per l'idrogel di laponite. Ipotizzando di voler utilizzare questo sistema per la somministrazione intra-articolare di KGN, il primo obiettivo è stato quello di andare a valutare la cinetica di rilascio della kartogenina. Sono stati presi in considerazione i sistemi HNT/KGN e HNT/KGN/Lap, ed è stata valutata la cinetica di rilascio sia in tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4 per mimare le condizioni fisiologiche, che *ex vivo* in liquido sinoviale. Come è possibile osservare dal profilo di rilascio della KGN da HNT/KGN in PBS pH 7.4 in figura 54 A, si assiste ad un rapido rilascio nella fase iniziale che diventa poi gradualmente più lento. È stato visto che nei primi 600 minuti viene rilasciato circa il 70% di KGN e che a seguire la molecola viene rilasciata lentamente per 7 giorni. Dopo aver valutato il rilascio di KGN da

HNT/KGN, è stato indagato anche il rilascio da HNT/KGN/Lap, sempre in PBS pH 7.4, con l'obiettivo di verificare se la dispersione di HNT/KGN nel gel di laponite potesse indurre un processo di rilascio del farmaco controllato nel tempo. Come indicano i risultati, il sistema ha la capacità di rilasciare la KGN per circa 24h (Figura 54 B); trascorso questo tempo, il gel inizia a dissolversi in PBS pH 7.4 ed il rilascio dal gel diventa molto simile a quello del sistema HNT/KGN. In figura 54 C, è riportata la quantità di KGN rilasciata in funzione del tempo dal sistema HNT/KGN.

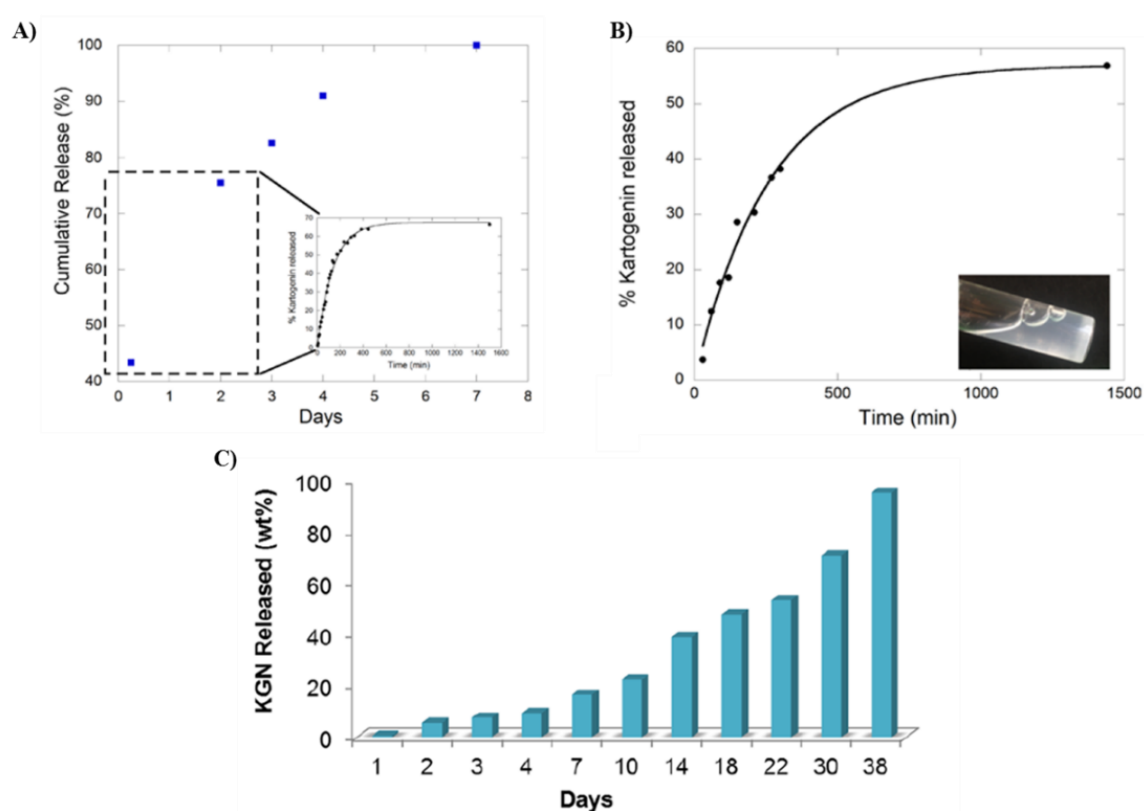


Figura 54. Cinetica di rilascio della kartogenina da: (A) HNT/KGN in PBS pH 7.4; (B) HNT/KGN/Lap in PBS pH 7.4; (C) HNT/KGN in liquido sinoviale.

In quest'ultimo caso la cinetica di rilascio è stata valutata *ex vivo* in liquido sinoviale, in queste condizioni si ha un rilascio molto più lento e prolungato di KGN che può durare fino a 38 giorni. Il rilascio più lento nel liquido sinoviale, rispetto a quello che avviene in PBS pH 7.4, potrebbe essere dovuto alla presenza di interazioni supramolecolari tra i nanotubi di

halloysite e le componenti del liquido sinoviale. Questo infatti, ha un valore di pH pari a 7.54 e in queste condizioni l'acido ialuronico, uno dei principali componenti del liquido sinoviale, esiste sotto forma di ialuronato, che potrebbe interagire con la carica positiva che è propria della cavità interna dell'halloysite creando qualcosa di simile ad un *lid* che induce il rallentamento del rilascio dal lume allositico, come già visto in altri studi (Dzamukova M. R. *et al.*, 2015).

4.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT/KGN

Poiché la biocompatibilità è una caratteristica fondamentale per l'applicazione di qualsiasi nanosistema in campo biomedico, è stata valutata attraverso saggi di vitalità cellulare l'eventuale citotossicità del composito ibrido HNT/KGN/Lap, utilizzando come sistema modello due linee cellulari: HepG2 (Hepatocellular Carcinoma cell line from *Homo sapiens*) e MC3TE-E1 (osteoblast precursor cell line derived from *Mus musculus* calvaria). Le prime sono state scelte poiché è noto che il fegato è uno degli organi principalmente coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici e gli epatociti in coltura sono ampiamente utilizzati negli studi sul loro metabolismo (Guillouzo A. *et al.*, 2007); gli osteoblasti invece sono stati scelti per vicinanza anatomica alla sede di applicazione. Come mostrato rispettivamente in figura 55 e 56, entrambe le linee cellulari sono state sottoposte a trattamenti di 48 e 72 h con differenti concentrazioni di HNT/Lap e HNT/KGN/Lap in PBS (le corrispondenti concentrazioni di kartogenina vanno da 0,1 a 10 μ M).

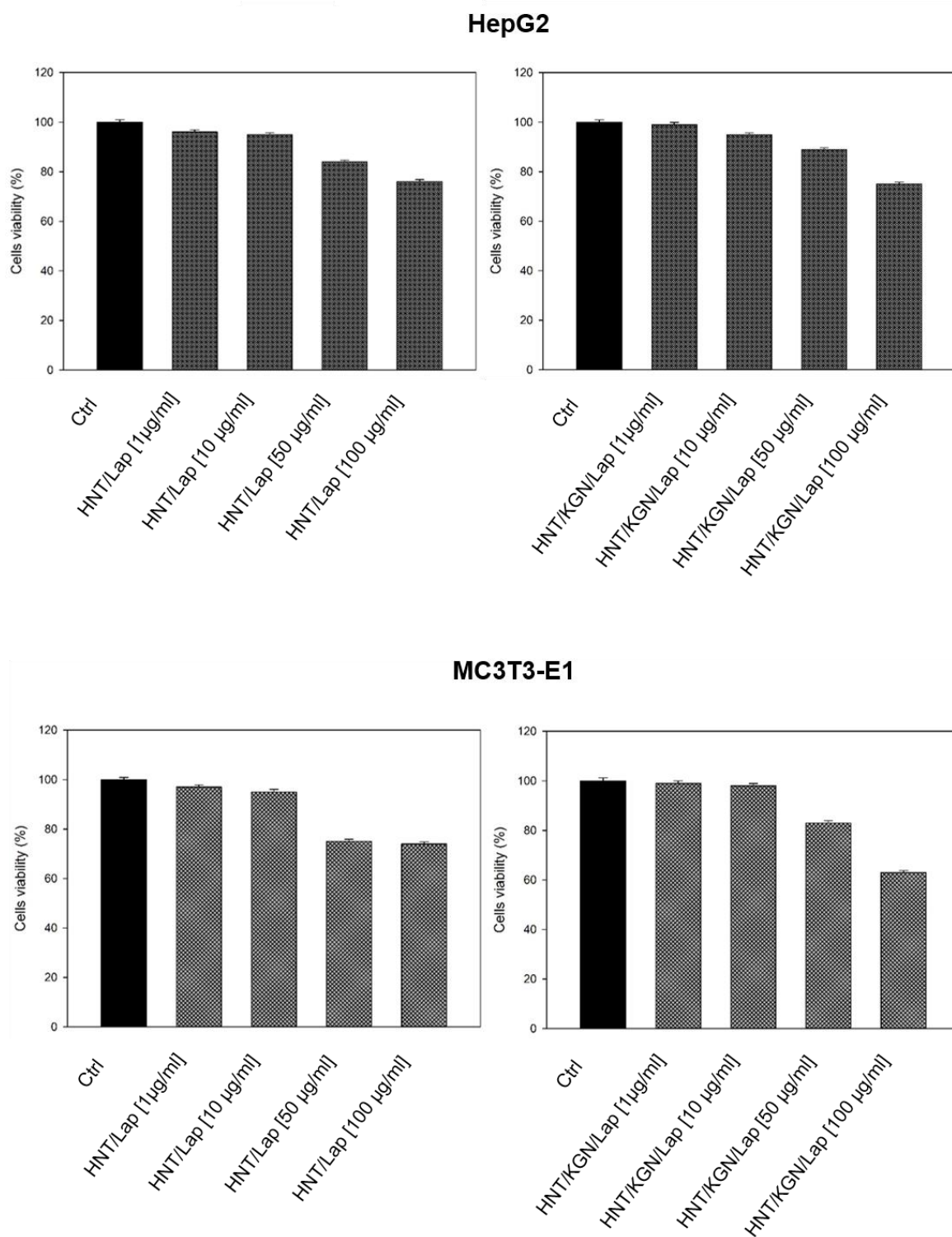


Figura 55. Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HepG2 e MC3T3-E1 dopo trattamento di 48 h con gli ibridi HNT/Lap e HNT/KGN/Lap.

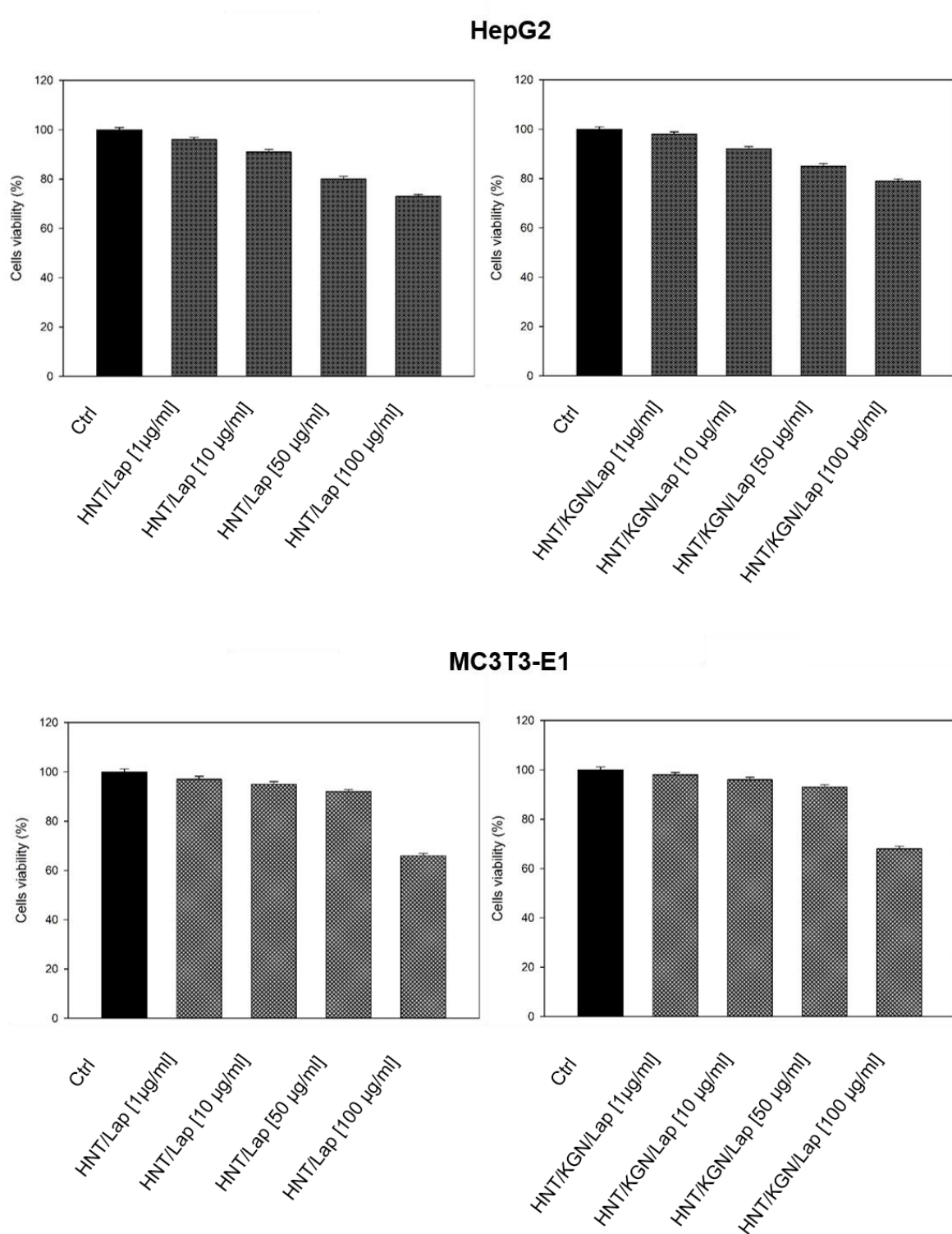


Figura 56. Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HepG2 e MC3T3-E1 dopo trattamento di 72 h con gli ibridi HNT/Lap e HNT/KGN/Lap.

Al termine dei trattamenti, la vitalità cellulare è stata misurata tramite saggio MTS e i risultati hanno mostrato che l'ibrido HNT/KGN/Lap non risulta essere citotossico alle concentrazioni investigate, in seguito a trattamenti di 48 h e 72h per entrambe le linee cellulari. È stata riscontrata una leggera diminuzione della vitalità cellulare in associazione alla più alta concentrazione di HNT. Poiché sia la kartogenina che l'idrogel di laponite alle concentrazioni investigate non inducono citotossicità (Hu Q. et al., 2017; Boyer C. *et al.*, 2018), questa leggera diminuzione della vitalità cellulare, relativamente alla concentrazione più alta, potrebbe essere dovuta ai nanotubi di halloysite. In effetti, come riportato in letteratura, l'assorbimento e la tossicità dei nanotubi dipende dalla linea cellulare ed è stato dimostrato per esempio che i HNT possono indurre una riduzione della vitalità delle cellule MCF-7 per concentrazioni fino a [75 µg/ml] (Johnson K. *et al.*, 2012), mentre mostrano un IC50 di 300 µg per 10⁵ cellule per la linea cellulare A549 (Kamalieva R.F. *et al.*, 2018).

5.1 Sistema ibrido HNTs/CDs

La terapia genica si è sviluppata rapidamente negli ultimi decenni (Cring M.R. *et al.*, 2020). Nonostante i vantaggi derivati dall'utilizzo dei vettori virali, in termini di efficacia del rilascio genico, il loro utilizzo può indurre risposte immunitarie ed effetti collaterali gravi con conseguente utilizzo limitato dal punto di vista clinico (Raper S.E *et al.*, 2003; Manno C.S. *et al.*, 2006). In questo contesto i *carrier* sintetici, in grado di formare complessi con gli acidi nucleici e di proteggerli da nucleasi intra- ed extra-cellulari, sono considerati una valida alternativa ai vettori virali (Durymanov M. *et al.*, 2018). Sfortunatamente però, l'applicazione clinica dei vettori non virali è limitata a causa della loro minore efficienza di trasfezione e a causa dell'impossibilità di seguirne il loro percorso. Di recente i *carbon dots* (CDs), grazie alla loro bassa tossicità, alla buona solubilità in acqua, alla elevata stabilità chimica e alla presenza di numerosi gruppi chimici protonabili sulla loro superficie, hanno attirato molto l'attenzione per il loro impiego come nanocarrier per il *gene delivery* (Mohammadinejad R. *et al.*, 2019). A partire da queste considerazioni, è stato sviluppato un nuovo sistema ibrido a base di nanotubi di halloysite e carbon dots (HNTs-CDs) per una possibile applicazione come vettore non virale per la terapia genica orale (Massaro M. *et al.*, 2019b). Inoltre, è emerso anche che la terapia genica orale rappresenta una strategia promettente in quanto a differenza delle tradizionali vie di somministrazione parenterale, è un approccio non invasivo che si presta ad un'elevata *compliance* del paziente e facilità di dosaggio (Farris E. *et al.*, 2018). Così come altri tipi di argille, i nanotubi di halloysite non presentano proprietà fotoluminescenti e questo rende difficile seguirne la loro localizzazione a livello cellulare. Come introdotto in precedenza però, grazie alle modifiche che possono essere apportate sulle superfici dei HNT, questo problema può essere superato. Sono diverse le strategie che ci permettono di rendere fluorescenti i nanotubi, in questo caso la superficie esterna è stata funzionalizzata tramite l'aggiunta di CDs. Questi hanno la capacità di assorbire la luce e a seconda della loro composizione chimica e della loro dimensione

emettono lunghezze d'onda differenti in un ampio spettro che va dal visibile all'infrarosso. Inoltre, possiedono elevata stabilità chimica, bassa tossicità, buona solubilità in acqua, elevata sensibilità e una fluorescenza molto stabile che li rende adatti per l'utilizzo come sonde fluorescenti nelle analisi di *bioimaging* (Abbasi E. *et al.*, 2016) o come *nanocarrier* per *gene delivery* (Mohammadinejad R. *et al.*, 2019). I CDs possono essere ottenuti a partire da vari precursori e presentare proprietà differenti. In questo caso, come precursori per la loro sintesi, sono stati utilizzati acido tartarico come fonte di carbonio ed etilendiammina (EDA) come agente passivante, come illustrato in figura 57.

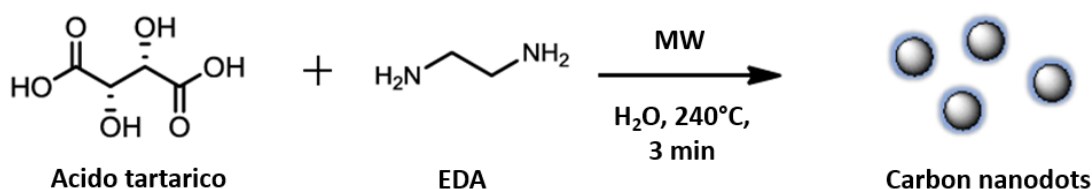


Figura 57. Schema di sintesi dei CDs utilizzando come precursori acido tartarico ed etilendiammina (EDA)

L'acido tartarico è stato scelto perché è una risorsa rinnovabile, facilmente reperibile in grandi quantità e presenta anche proprietà antiossidanti. L'EDA, tra le altre ammine può portare alla produzione di CDs con una buona fotoluminescenza (Wu S. *et al.*, 2016; Wu S. *et al.*, 2017). Successivamente tramite legame covalente dei CDs sulla superficie esterna, sono stati sintetizzati HNT fluorescenti (HNTs-CDs). Questi sono stati ottenuti tramite irradiazione a microonde di una soluzione acquosa del composto 1 (preparato in precedenza come riportato in Cataldo S. *et al.*, 2018) ed etilenendiammina (EDA) come rappresentato in figura 58, ottenendo una percentuale di caricamento della porzione organica stimata tramite analisi termogravimetrica (TGA), pari al 3,1% in peso.

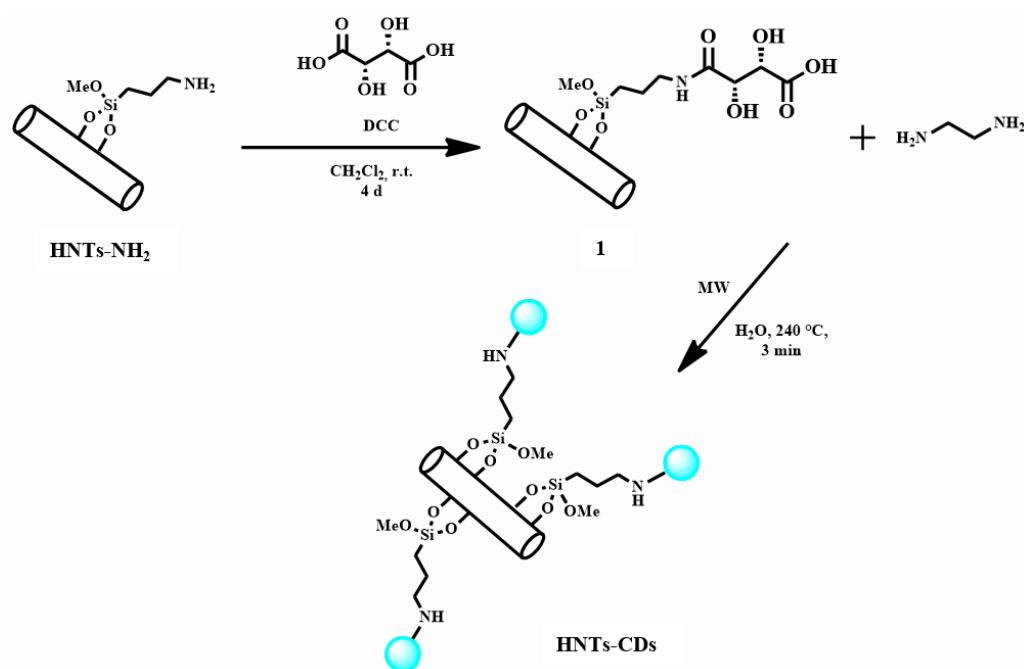


Figura 58. Rappresentazione schematica della sintesi di HNT-CDs.

5.2 Biocompatibilità del sistema ibrido HNT-CDs

Poiché questo sistema potrebbe essere utilizzato per diverse applicazioni in campo biologico, sono stati valutati i suoi effetti citotossici *in vitro*, utilizzando come sistema modello cellule HeLa. Le cellule sono state incubate per 24 h con diverse concentrazioni di HNTs-CDs ed al termine del trattamento, è stata valutata la vitalità cellulare tramite saggio MTS. L'ibrido HNT-CDs mostra una citotossicità estremamente bassa anche alla massima concentrazione pari a [30 mg/ml] (Figura 59), in accordo con i dati riportati in letteratura per HNT *pristine* (Wang X. *et al.*, 2018). Grazie all'utilizzo dei nanotubi di halloysite e dell'acido tartarico come precursore, combinati ad un processo di sintesi *green* come quello delle microonde (MW), senza l'aggiunta di solventi tossici o processi di trattamento aggressivi si riesce a creare un nanomateriale altamente biocompatibile (Xu H.V. *et al.*, 2018).

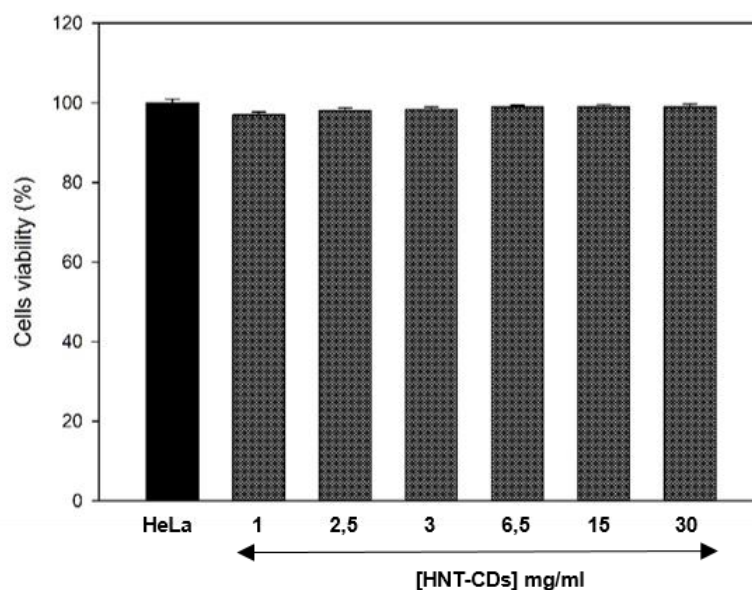


Figura 59. Saggio di vitalità cellulare MTS in cellule HeLa trattate per 24 h con diverse concentrazioni di HNT-CDs.

5.3 Uptake dell'ibrido HNT-CDs

Per valutare le proprietà fotoluminescenti del sistema HNT-CDs e la sua localizzazione a livello cellulare è stata utilizzata la microscopia a fluorescenza. Nello specifico, cellule HeLa sono state trattate prima con diverse concentrazioni di CDs liberi (da $5 \mu\text{g/ml}$ a $20 \mu\text{g/ml}$) per 4 h. Terminato il trattamento sono state osservate al microscopio a fluorescenza ed è emerso che i CDs, se eccitati ad opportune lunghezze d'onda, presentano delle proprietà fotoluminescenti nel verde e nel rosso e grazie a queste proprietà è stato possibile osservare che si distribuiscono uniformemente a livello citoplasmatico come rappresentato in figura 60. Successivamente, le cellule sono state trattate per 4 h con diverse concentrazioni dell'ibrido HNT-CDs (da $0,16 \text{ mg/ml}$ a $1,6 \text{ mg/ml}$) ed osservate al microscopio a fluorescenza, con l'obiettivo di verificarne l'internalizzazione e di studiarne la distribuzione cellulare. Dai risultati mostrati in figura 61 è emerso che i HNT-CDs, a differenza di quanto accade per i CDs liberi, si distribuiscono principalmente a livello della zona perinucleare. Inoltre, è interessante notare che anche a livello dei nuclei è presente un segnale fluorescente.

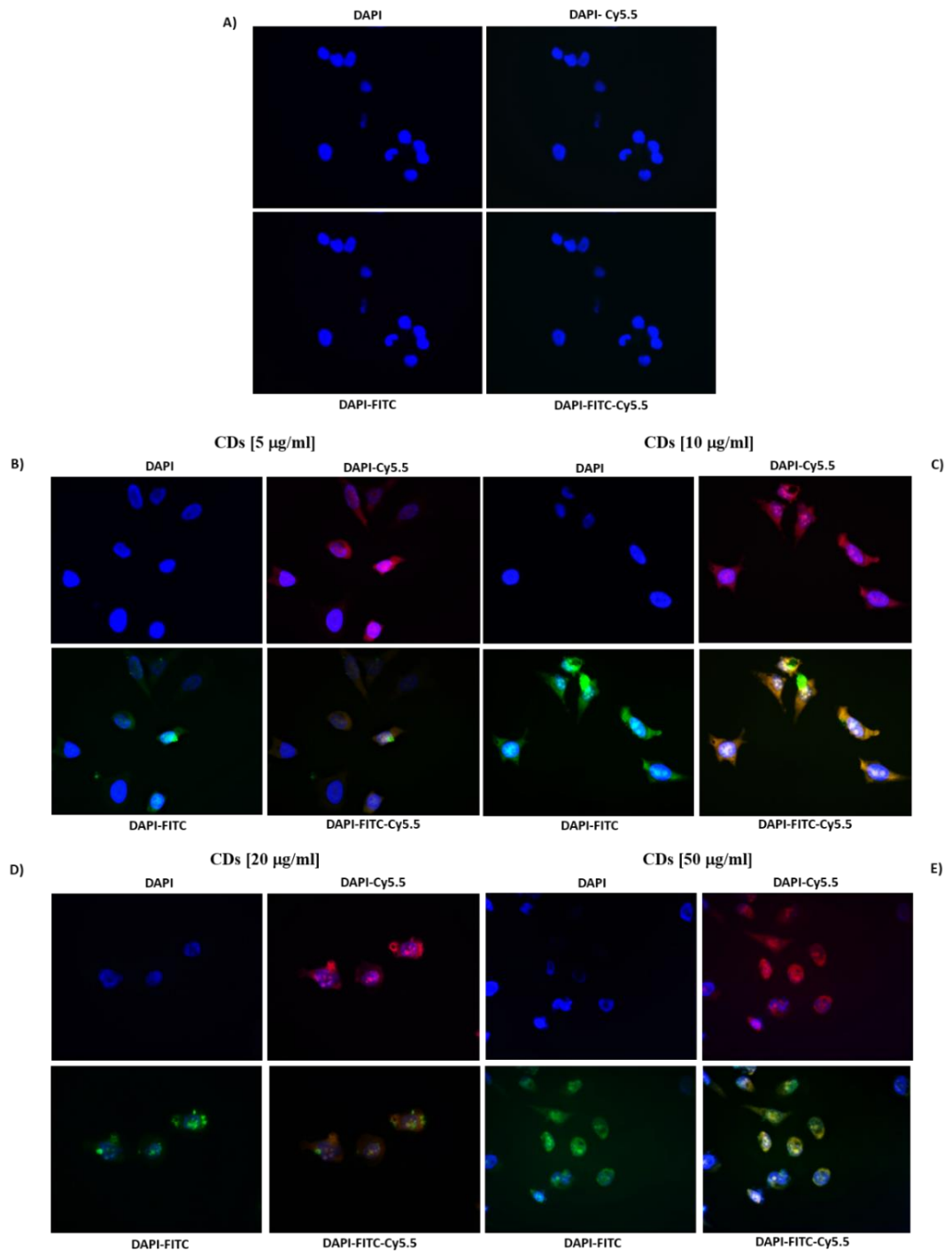


Figura 60. microscopia a fluorescenza cellule HeLa (A); cellule HeLa trattate per 4 h con CDs [5 µg/ml] (B); cellule HeLa trattate per 4 h con CDs [10 µg/ml] (C); cellule HeLa trattate per 4 h con CDs [20 µg/ml] (D); cellule HeLa trattate per 4 h con CDs [50 µg/ml] (E); ingrandimento 40X.

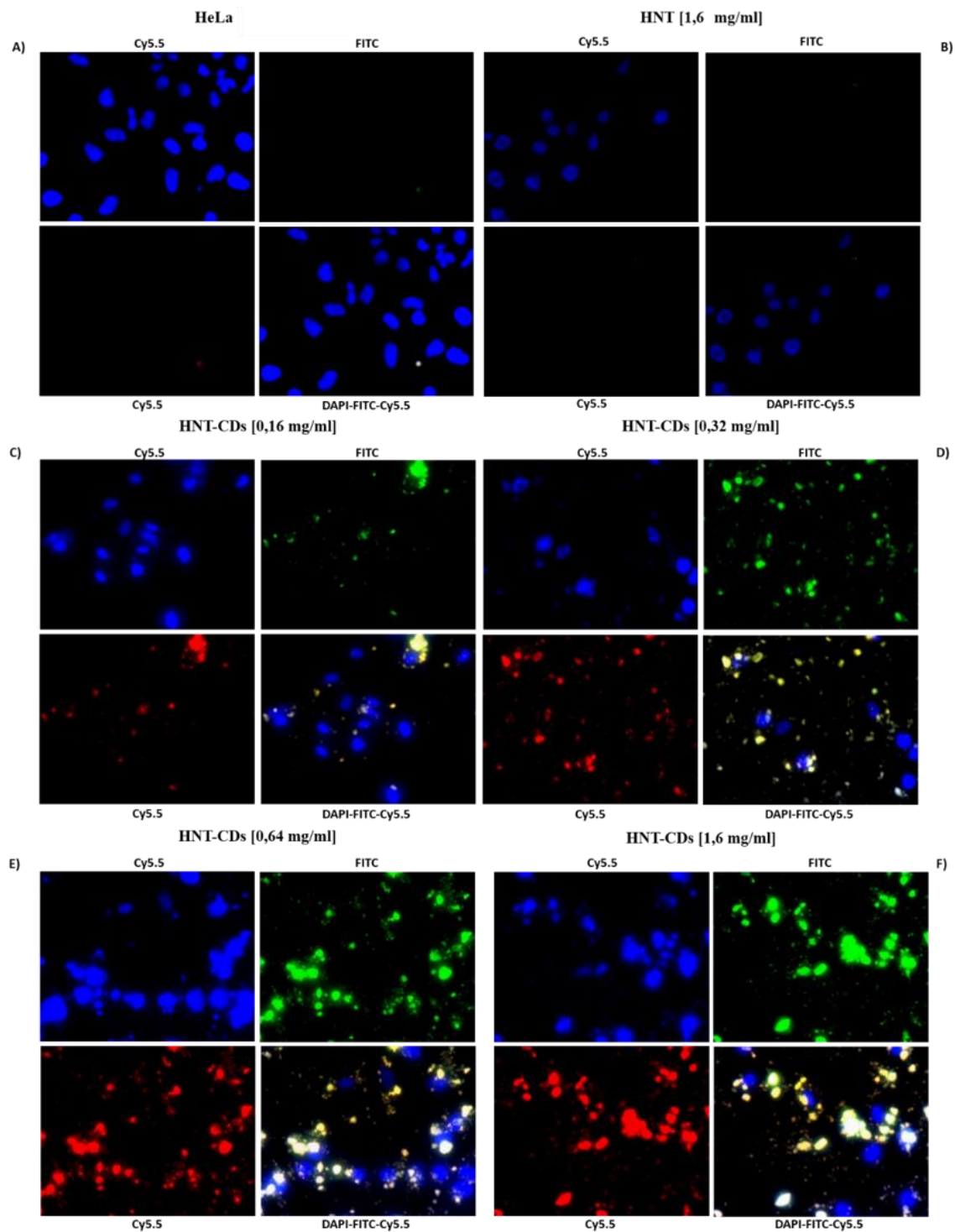


Figura 61. Immagini microscopia a fluorescenza cellule HeLa (A); cellule HeLa trattate con HNT [1,6 mg/ml] per 4 h (B); cellule HeLa trattate per 4 h con HNT-CDs [0,16 mg/ml] (C); cellule HeLa trattate per 4 h con HNT-CDs [0,32 mg/ml] (D); cellule HeLa trattate per 4 h con HNT-CDs [0,64mg/ml] (E); cellule HeLa trattate per 4 h con HNT-CDs [1,6 mg/ml] (F); ingrandimento 40X.

Sfruttando le proprietà fotoluminescenti dei CDs, per dimostrare ulteriormente che l'ibrido viene internalizzato a livello cellulare e per avere informazioni non solo dal punto di vista quantitativo ma anche relativo alle tempistiche del processo di internalizzazione, sono state eseguite indagini di citofluorimetria a flusso (utilizzando i canali FL1-H e FL2-H). Le cellule HeLa sono state trattate per diversi intervalli di tempo (30' - 2 h - 4 h - 24 h) con HNT-CDs [0,32 mg/ml]. I risultati (Figura 62) dimostrano che HNT-CDs è in grado di oltrepassare quasi totalmente la membrana cellulare dopo 30 minuti di incubazione, come mostrato dallo spostamento dell'intensità di fluorescenza alla seconda decade sia in FL1-H (78% di eventi positivi) che in FL2-H (83% di eventi positivi). Questo risultato è sorprendente poiché, da quanto noto in letteratura, affinché i HNT vengano internalizzati a livello cellulare sono necessarie 24 h (Massaro M. *et al.*, 2015b). Questo dato potrebbe essere spiegato dalla presenza di gruppi amminici primari sulla superficie dell'ibrido HNT-CDs, che potrebbero promuovere l'assorbimento del nanomateriale migliorando l'interazione con la membrana cellulare. Aumentando il periodo di incubazione si nota soltanto un leggero incremento dell'intensità di fluorescenza, fino ad arrivare a 24 h dopo il trattamento con HNT-CDs in cui si ha l'89% di eventi positivi in FL1-H e l'86% per FL2-H, confermando quindi che la maggior parte del nanosistema viene internalizzato già dopo mezz'ora di trattamento.

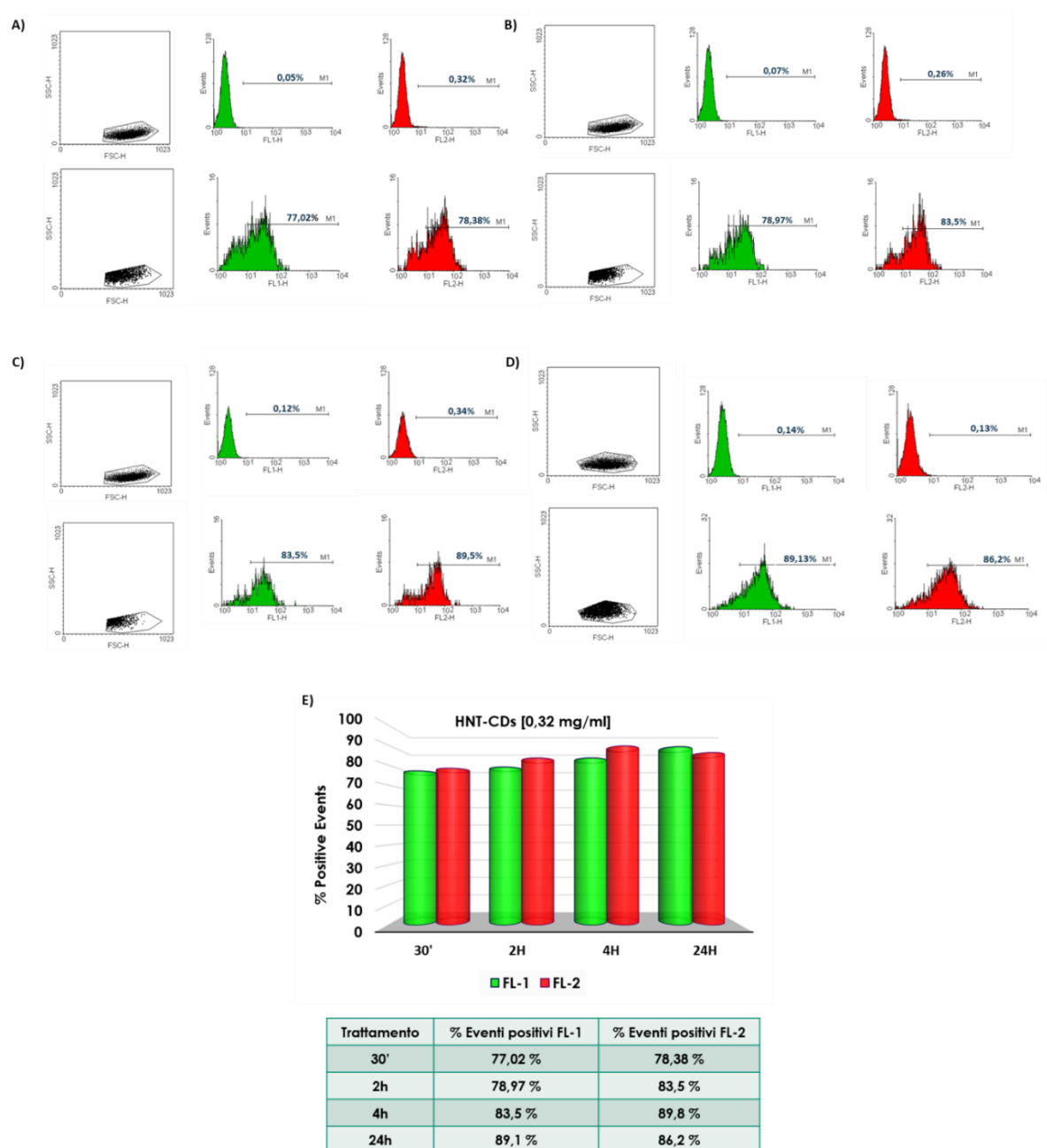


Figura 62. Analisi citofluorimetrica in cellule HeLa trattate con HNT-CDs [0,32 mg/ml] per 30' (A); 2 h (B); 4 h (C); 24 h (D); grafico riepilogativo sulla % di eventi positivi FL-1 e FL-2 a seguito dei vari trattamenti.

5.4 Attività antiossidante dell'ibrido HNT-CDs

Con il termine stress ossidativo si intende l'alterazione dell'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e difesa antiossidante dei sistemi biologici in grado di rimuoverli, i cui effetti sono alterazioni metaboliche, danno e morte cellulare (Pizzimenti S.

et al., 2010). Tra gli agenti antiossidanti in grado di ridurre lo stress ossidativo si considera l’N-acetil-cisteina (NAC), uno dei precursori del glutathione ridotto (GSH) noto per il suo ruolo come *scavenger* di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (Fang Y.Z. *et al.*, 2002). L'attività antiossidante di HNT-CDs è stata valutata contestualmente alla vitalità cellulare tramite saggio MTS in cellule HeLa trattate per 24 h con perossido di idrogeno (H_2O_2) per indurre stress ossidativo e N-acetilcisteina (NAC) come controllo dell'attività antiossidante. Inoltre, le cellule sono state trattate anche con diverse concentrazioni di HNT-CDs comprese tra 0,04 e 1 mg/mL (concentrazioni riferite ai CDs coniugati con HNT) per 24 h. I risultati (Figura 63) dimostrano che lo stress ossidativo indotto dal trattamento con H_2O_2 [100 μ M], viene ripristinato aumentando la concentrazione di HNT-CDs, confermando che questo possiede la capacità di contrastare la produzione di specie reattive dell’ossigeno indotta dal trattamento con H_2O_2

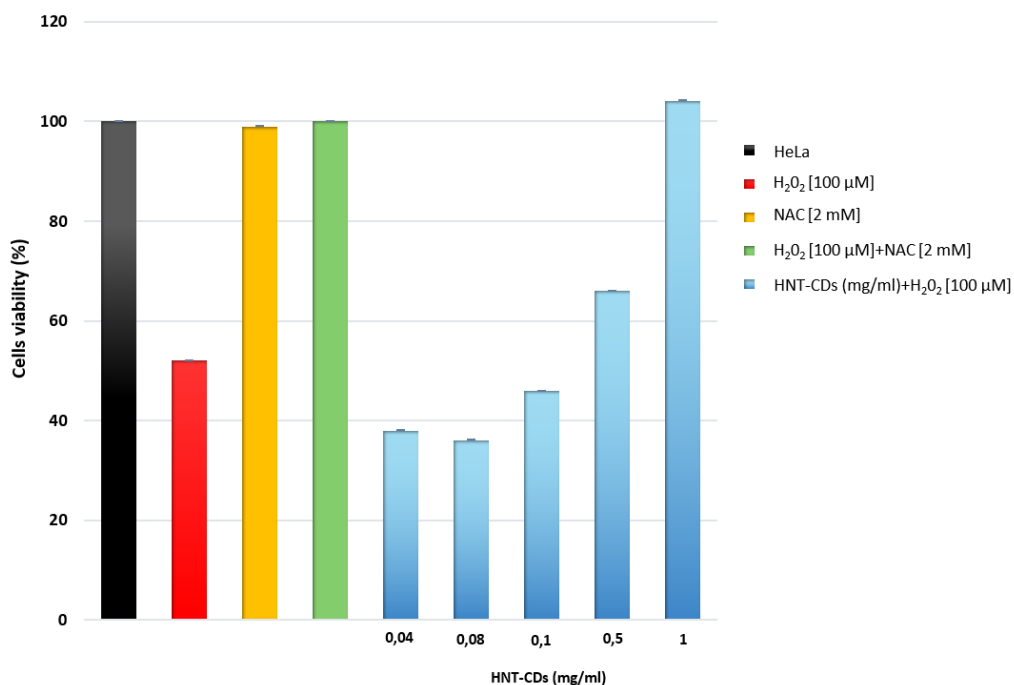


Figura 63. Attività antiossidante dell’ibrido HNT-CDs in cellule HeLa trattate per 24 h con H_2O_2 [100 μ M] e concentrazioni crescenti di HNT-CDs.

5.5 Interazione HNT-CDs / DNA

Poiché questo sistema ibrido HNT-CDs potrebbe essere utilizzato come potenziale vettore non virale per la terapia genica orale, è stata valutata la sua capacità di legare il DNA. Nello specifico, è stata studiata l'interazione di HNT-CDs con ct-DNA (calf timus-DNA). Il caricamento è stato effettuato mescolando l'ibrido con una soluzione di ct-DNA altamente concentrata e la sospensione ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Tramite analisi termogravimetrica (TG) è stato stimato che la quantità di ct-DNA adsorbito su HNT-CDs era pari al 6,0% in peso. La capacità di interazione ibrido/DNA è stata valutata tramite spettroscopia di fluorescenza, calorimetria differenziale a scansione (DSC) e dicroismo circolare come spiegato in Massaro *et al.*, (2019b). Tramite spettroscopia di fluorescenza è stata dimostrata l'interazione tra ct-DNA e HNT-CDs. Le misure di dicroismo circolare hanno mostrato che l'interazione del DNA con i nanotubi non induce alterazioni nella struttura del DNA ed inoltre, le analisi DCS hanno dimostrato dei benefici, in termini di stabilità termica, per il DNA. Valutando la cinetica di rilascio ad una temperatura di 37 °C (a valori di pH pari a 1.0 e in tampone TRIS-HCl a pH 7.4) mediante dialisi è emerso che la quantità di ct-DNA rilasciato in tampone TRIS-HCl è inferiore a quella rilasciata a valori di pH acido (Figura 64).

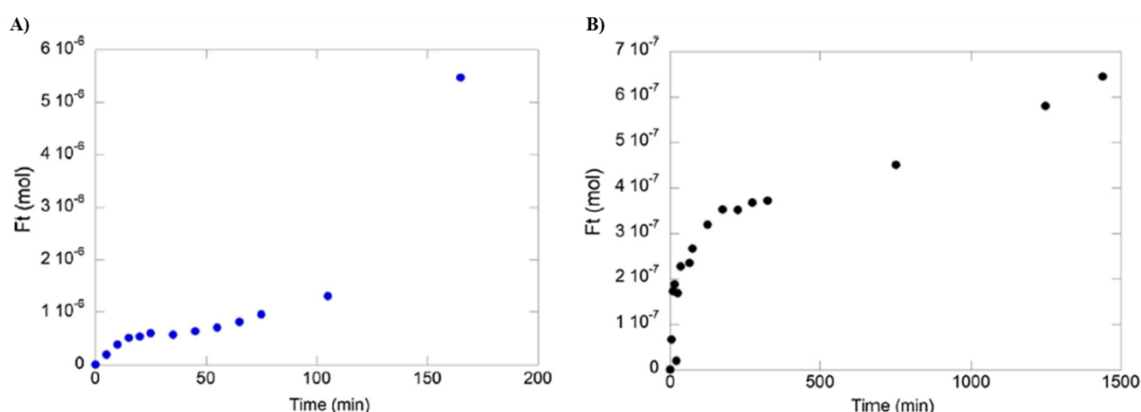


Figura 34. Cinetica di rilascio di ct-DNA dal complesso HNT-CDs/ct-DNA in A) HCl 0,1 N e B) Tris-HCl pH 7.4

Questo comportamento potrebbe essere giustificato dal fatto che in mezzo acido, la repulsione elettrostatica tra la superficie del sistema HNT-CDs e il ct-DNA incrementa la velocità di rilascio. Possiamo quindi dire che la funzionalizzazione dei nanotubi di halloysite con i CDs, permette la sintesi di un materiale biocompatibile ma soprattutto con buona capacità di internalizzazione, facile da seguire a livello cellulare e che si localizza vicino al nucleo. HNT-CDs potrebbe quindi essere un nuovo alleato da utilizzare in ambito farmaceutico come sistema di *drug carrier* o come potenziale vettore non virale per la terapia genica orale.

Conclusioni

Conclusioni

Il crescente interesse nel campo delle nanotecnologie e della nanomedicina ha portato oltre allo sviluppo di sistemi di *drug carrier* e *delivery* di origine sintetica, anche alla ricerca di materiali nanostrutturati che fossero presenti in natura. Tra questi ci sono i nanotubi di halloysite (HNT), un tipo di minerale naturale facilmente reperibile in grandi quantità, biocompatibile, non tossico e di dimensioni nanometriche. Negli ultimi anni la ricerca ha investito molto sullo sviluppo di nuovi sistemi di *drug carrier* e *delivery* con il principale obiettivo di ottenere sistemi che abbiano un'azione farmacologica mirata ed efficace, che possano ridurre i costi generali dei trattamenti, le quantità di farmaci utilizzati, il numero di somministrazioni, e soprattutto gli effetti collaterali per il paziente. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare le proprietà biologiche di nuovi materiali ibridi a base di nanotubi di halloysite e molecole organiche per una potenziale applicazione nel campo del *drug carrier* e *delivery*. Incapsulando le molecole in un supporto solido quale l'halloysite, infatti, si può beneficiare di un rilascio sostenuto e controllato nel tempo. Inoltre, grazie alla cavità interna nano-dimensionata che svolge attività di protezione nei confronti delle molecole, si ottiene un conseguente miglioramento dell'attività biologica. Infatti, molti composti biologicamente attivi sono sensibili al calore, alla luce e all'ossigeno e l'utilizzo dell'halloysite consente di migliorare la loro stabilità, proteggendoli dall'ossidazione e dalla fotodegradazione. Tutti i sistemi ibridi presi in considerazione in questo studio sono stati valutati dal punto di vista biologico e alla luce dei risultati ottenuti è possibile concludere che questi non inducono citotossicità su tutte le linee cellulari utilizzate come sistemi modello, rivelando quindi che sono altamente biocompatibili. Poiché la comprensione delle vie di internalizzazione cellulare degli HNT potrebbe essere di aiuto nella progettazione razionale di nuovi sistemi di somministrazione di farmaci, e potrebbe essere di grande valore per le loro applicazioni in campo biomedico, attraverso saggi di inibizione *in vitro*, sono stati valutati i meccanismi coinvolti nell'*uptake* del sistema ibrido HNT/1. Per comprendere se

questi meccanismi potessero essere diversi in base al tipo cellulare, sono state utilizzate come sistemi modello due linee cellulari con caratteristiche differenti, ovvero le HeLa che sono cellule epiteliali e le Raw 264.7 che sono invece dei macrofagi. Dall'analisi dei risultati si evince che in entrambe le linee cellulari l'internalizzazione dei nanotubi avviene in maniera energia dipendente. È emerso infatti che, inducendo una deplezione di ATP a livello cellulare, trattando le cellule con *Sodium azide*, si assiste ad una riduzione dell'internalizzazione di HNT/1 pari al 50%, sia in cellule HeLa che in Raw 264.7. Inoltre è stato visto, che esiste una combinazione di diversi meccanismi endocitici quali endocitosi mediata da clatrina, endocitosi clatrina indipendente e fagocitosi. I meccanismi di internalizzazione delle nanoparticelle possono variare in base alle loro dimensioni, alla carica superficiale e alla composizione. Poiché il tipo di endocitosi coinvolta nell'internalizzazione dipende principalmente dalle dimensioni delle nanoparticelle, i risultati ottenuti potrebbero dipendere dall'eterogeneità delle dimensioni degli HNT. L'ibrido HNT/KGN/Lap, potrebbe essere considerato un valido sistema per il potenziale rilascio intra-articolare di kartogenina nel trattamento delle osteoartriti. Questa molecola, se somministrata tramite iniezioni intra-articolari, ha la capacità di indurre il differenziamento delle cellule mesenchimali staminali in condrociti, responsabili della produzione di cartilagine. A causa della sua idrofobicità e della sua scarsa stabilità in mezzo acquoso, il suo utilizzo per applicazioni farmacologiche risulta limitato. Caricando la kartogenina nel lume dei nanotubi di halloysite, è stato possibile ottenere un rilascio controllato e prolungato nel tempo. Questo potrebbe evitare l'inconveniente di dover sottoporre i pazienti a trattamenti continui e ravvicinati tra loro, con conseguente miglioramento dell'efficacia terapeutica e della qualità della vita. Per quanto riguarda invece il sistema ibrido HNT-CDs, i risultati hanno dimostrato che oltre ad essere altamente biocompatibile, possiede anche attività antiossidante. Tramite analisi di microscopia a fluorescenza è stato visto che si localizza principalmente a livello perinucleare e che, anche se in misura minore, riesce ad

entrare anche nel nucleo. Sfruttando le proprietà fotoluminescenti del sistema HNT-CDs è emerso, in seguito ad analisi di citometria a flusso, che il composito è in grado di oltrepassare la membrana cellulare in brevissimo tempo, ottenendo circa il 77% di internalizzazione dopo soli 30 minuti di incubazione. Questo è un risultato sorprendente, poiché è noto in letteratura che i nanotubi *pristine* impiegano in media circa 24 ore per essere internalizzati a livello cellulare. Tramite spettroscopia di fluorescenza è stata dimostrata l'interazione tra il DNA e il sistema HNT-CDs. Le misure di dicroismo circolare hanno messo in evidenza che in seguito all'interazione con i nanotubi, il DNA non riporta alterazioni dal punto di vista strutturale. Inoltre, la cinetica di rilascio in mezzo fisiologico ci permette di pensare che questo ibrido possa rappresentare un valido sistema da utilizzare come vettore non virale per la terapia genica orale evitando, ad esempio, la degradazione del DNA durante il transito lungo il tratto gastrointestinale. Sfruttando le proprietà fotoluminescenti, potrebbe trovare applicazioni anche nel campo del *bioimaging*. Nel complesso i risultati ottenuti, aprono ampie prospettive di indagine al fine di comprendere meglio l'impiego di questi sistemi per una potenziale applicazione come sistemi di *drug carrier* e *delivery*. La combinazione delle innumerevoli proprietà dei nanotubi di halloysite, insieme alla loro biocompatibilità e alla possibilità di funzionalizzare le superfici li rende candidati ideali per lo sviluppo di un approccio terapeutico innovativo.

Materiali e Metodi

6.1 Materiali

I nanotubi di halloysite sono stati acquistati presso Sigma Aldrich e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. Penicillin-Streptomycin (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL), Trypsin-EDTA 10X, Cytochalasin D, Nocodazole, Chlorpromazine hydrochloride, Sodium azide NaN_3 , Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-Max, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X (DPBS), Paraformaldehyde (PFA) 95%, Hydrogen peroxide solution (H_2O_2), N-Acetyl-L-cysteine (NAC), Bovin Serum Albumin (BSA) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich. Tutte le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti svolti in questo lavoro, sono state acquistate presso ATCC (American Type Culture Collection). I terreni di coltura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) e il siero fetale bovino inattivato al calore (HI-FBS) sono stati acquistati presso Gibco. Il colorante nucleare Hoechst 33342 è stato acquistato presso Invitrogen. Per i saggi di vitalità cellulare è stato utilizzato il kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Le letture dei valori di assorbanza sono state effettuate tramite il lettore iMark Plate Reader-BioRad. Le immagini di microscopia a fluorescenza sono state acquisite utilizzando il microscopio *Leica* DMRA2. Per le analisi di citometria a flusso è stato utilizzato il citofluorimetro BD-FACSCalibur (Becton Dickinson). Sistema ibrido HNT/1: il composto 1 (Curcumina-Bodipy) è stato donato dalla Prof.ssa Paola Bonaccorsi del Dipartimento di Scienze chimiche, biologiche, farmaceutiche e ambientali, Università degli Studi di Messina. La membrana da dialisi (Molecular Weight Cut Off (MWCO) 12 14000 Daltons, diametro di 21,5 mm) utilizzata per la valutazione della cinetica di rilascio del composto 1 (Curcumina-Bodipy) dal sistema ibrido HNT/1 è stata acquistata presso Medicell International Ltd. Sistema ibrido HNT/KGN/Lap: la Laponite ($\text{Na}^{0.7} + [(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3}) \text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{0.7-}$) è un prodotto Rockwood.

Sistema ibrido HNT-CDs: tutti i reagenti necessari per la sintesi di HNT-CDs e CDs sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione.

Tutti i sistemi ibridi sono stati sintetizzati e analizzati dalla componente chimica del gruppo della Professoressa Riela, secondo le metodologie di seguito riportate.

6.2 Modelli sperimentali *in vitro*

6.2.1 Cellule HeLa: Le cellule HeLa sono cellule tumorali umane immortalizzate isolate da carcinoma della cervice uterina. Il loro tempo di duplicazione è di 24 ore e crescono in adesione. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37° C + 5% CO₂ in fiasche da 25 cm², utilizzando come terreno di coltura RPMI 1640 in cui sono contenute biotina, vitamina B12 e PABA. Al momento dell'utilizzo è stato addizionato con Penicillina-Streptomicina (100 U/mL penicillina e 100 µg/ml streptomicina) e FBS che costituisce il 5% del volume finale.

Protocollo di mantenimento cellulare di HeLa in fiasca da 25 cm²:

- È stato aspirato il terreno dalla fiasca con le cellule in coltura.
- È stato eseguito un lavaggio in 3 ml di PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato rimosso il PBS 1X.
- È stato aggiunto 1 ml di Tripsina 1X e la coltura è stata incubata a 37° C + 5% CO₂ per 2 minuti circa.
- Sono stati aggiunti 2 ml di RPMI + 5% FBS per bloccare l'azione della tripsina.
- Le cellule sono state recuperate in un tubo da 15 ml e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm.
- È stato rimosso il sovrantante.
- Sono stati aggiunti 2 ml di RPMI + 5% FBS e successivamente sono stati disgregati tutti i *cluster* cellulari.

- Sono stati presi 0,5 ml di sospensione cellulare e sono stati trasferiti in una fiasca da 25 cm² contenente 6,5 ml di RPMI + 5% FBS.
- Le cellule sono state incubate a 37° C + 5% CO₂.

6.2.2 Cellule Raw 264.7: Le cellule Raw 264.7 sono macrofagi murini derivati da un tumore indotto dal virus della leucemia murina di Abelson. Il loro tempo di duplicazione è di circa 24 ore e crescono in adesione. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37° C + 5% CO₂ in fiasche da 25 cm², utilizzando come terreno di coltura RPMI 1640 in cui sono contenute biotina, vitamina B12 e PABA. Al momento dell'utilizzo è stato addizionato con Penicillina-Streptomicina (100 U/mL penicillina e 100 µg/ml streptomicina) e FBS che costituisce il 10% del volume finale.

Protocollo di mantenimento cellulare di 264.7 in fiasca da 25 cm²:

- È stato aspirato il terreno dalla fiasca con le cellule in coltura.
- È stato eseguito un lavaggio in 3 ml di PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato rimosso il PBS 1X.
- Sono stati aggiunti 3 ml di RPMI + 10% FBS e le cellule sono state staccate utilizzando un *cell scraper*.
- Le cellule sono state recuperate in un tubo da 15 ml e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm.
- È stato rimosso il sovrnatante.
- Sono stati aggiunti 2 ml di RPMI + 10% FBS e successivamente sono stati disgregati tutti i *cluster* cellulari.
- Sono stati presi 0,5 ml di sospensione cellulare e sono stati trasferiti in una fiasca da 25 cm² contenente 6,5 ml di RPMI + 10% FBS.
- Le cellule sono state incubate a 37° C + 5% CO₂.

6.2.3 Cellule Hep-G2: Le cellule Hep-G2 sono cellule tumorali immortalizzate umane, isolate da carcinoma epatocellulare (HCC) differenziato. Il loro tempo di duplicazione è di circa 24 ore e crescono in adesione. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37° C + 5% CO₂ in fiasche da 25 cm², usando come terreno di coltura RPMI 1640 in cui sono contenute biotina, vitamina B12 e PABA. Al momento dell'utilizzo è stato addizionato con Penicillina-Streptomicina (100 U/mL penicillina e 100 µg/ml streptomicina) e FBS che costituisce il 10% del volume finale.

Protocollo di mantenimento cellulare di Hep-G2 in fiasca da 25 cm²:

- È stato aspirato il terreno dalla fiasca con le cellule in coltura.
- È stato eseguito un lavaggio in 3 ml di PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato rimosso il PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato aggiunto 1 ml di Tripsina 1X e la coltura è stata incubata a 37° C + 5% CO₂ per 4 minuti circa.
- Sono stati aggiunti 2 ml di RPMI + 10% FBS per bloccare l'azione della tripsina.
- Le cellule sono state recuperate in un tubo da 15 ml e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm.
- È stato rimosso il sovrnatante.
- Sono stati aggiunti 2 ml di RPMI + 10% FBS e successivamente sono stati disgregati tutti i cluster cellulari.
- Sono stati presi 0,5 ml di sospensione cellulare e sono stati trasferiti in una fiasca da 25 cm² contenente 6,5 ml di RPMI + 10% FBS.
- Le cellule sono state incubate a 37° C + 5% CO₂.

6.2.4 Cellule MC3T3-E1: sono una linea cellulare precursore degli osteoblasti (pre-osteoblasti) isolati dalla parte superiore del cranio di *Mus musculus*. Crescono in adesione

ed hanno un tempo di duplicazione di circa 24 h. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37° C + 5% CO₂ in fiasche da 25 cm², usando come terreno di coltura DMEM high glucose. Al momento dell'utilizzo è stato addizionato con Penicillina-Streptomicina (100 U/mL penicillina e 100 µg/ml streptomicina) e FBS che costituisce il 10% del volume finale.

Protocollo di mantenimento cellulare di MC3T3-E1 in fiasca da 25 cm²

- È stato aspirato il terreno dalla fiasca con le cellule in coltura.
- È stato eseguito un lavaggio in 3 ml di PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato rimosso il PBS 1X (senza Ca²⁺ e Mg²⁺).
- È stato aggiunto 1 ml di Tripsina 1X e la coltura è stata incubata a 37° C + 5% CO₂ per 4 minuti circa.
- Sono stati aggiunti 2 ml di DMEM + 10% FBS per bloccare l'azione della tripsina.
- Le cellule sono state recuperate in un tubo da 15 ml e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm.
- È stato rimosso il sovrnatante.
- Sono stati aggiunti 2 ml di DMEM + 10% FBS e successivamente sono stati disgregati tutti i cluster cellulari.
- Sono stati presi 0,5 ml di sospensione cellulare e sono stati trasferiti in una fiasca da 25 cm² contenente 6,5 ml di DMEM + 10% FBS.
- Le cellule sono state incubate a 37° C + 5% CO₂.

6.3 Sistema ibrido HNT/1

6.3.1 Sintesi HNT/1

Ad una dispersione di HNT *pristine* (p-HNT) in acqua deionizzata (5ml) è stato aggiunto 1 ml di una soluzione 7,4 mM di composto 1 in acetonitrile. La dispersione ottenuta è stata sottoposta a 3 cicli di vuoto per aumentare il caricamento ed è stata lasciata in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente, la polvere è stata lavata con acqua e quindi essiccata a 60° C sotto vuoto. L'efficienza di caricamento è stata calcolata in base alla concentrazione di partenza del composto 1 ed è risultata essere pari al 74%.

6.3.2 Cinetica di rilascio

Il rilascio del composto 1 dall'ibrido HNT/1 è stato valutato come segue: 25 mg del campione sono stati dispersi in tampone fosfato pH 7,4 (1 ml) e trasferiti in una membrana da dialisi con diametro di 21,5 mm. La membrana è stata quindi posta in agitazione in un pallone contenente 9 ml del mezzo di rilascio a 37° C. A intervalli regolari è stato prelevato ed analizzato 1 ml del mezzo di rilascio per le letture allo spettrofotometro, controllando il picco di assorbimento del composto 1 a 522 nm. Affinché il volume del mezzo di rilascio rimanesse costante è stato aggiunto ogni volta 1 ml di soluzione fresca per sostituire il volume prelevato.

6.3.3 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa e Raw 264.7 dopo trattamento con HNT/1

Questo saggio sfrutta un metodo colorimetrico con lo scopo di determinare il numero di cellule vitali dopo trattamento con un'eventuale sostanza citotossica (in questo caso con HNT/1). L' MTS viene ridotto dalle cellule nel prodotto colorato formazano che è solubile nel mezzo di coltura, in una reazione catalizzata delle deidrogenasi mitocondriali delle

cellule vive e metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotto è stata rilevata leggendo i valori di assorbanza a 490 nm ed è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. Per testare la biocompatibilità dell'ibrido HNT/1, le cellule HeLa e Raw 264.7 sono state piastrate ad una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto in piastra da 96 con i rispettivi terreni di coltura ed incubate *overnight* a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Il giorno seguente è stato aspirato il terreno e sono state trattate con concentrazioni crescenti di HNT/1, Curcumina-Bodipy [1] e acetonitrile secondo lo schema in tabella 3 e incubate per 24 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$.

Concentrazioni HNT/1			
	[HNT]	Curcumina-Bodipy [1]	Acetonitrile
HNT/1	44 $\mu\text{g/ml}$	5 μM	0,67 %
HNT/1	88 $\mu\text{g/ml}$	10 μM	1,35 %
HNT/1	176 $\mu\text{g/ml}$	20 μM	2,7 %

Tabella 3. Schema delle concentrazioni relative a HNT/1 per il saggio di vitalità cellulare su cellule HeLa e Raw 264.7.

Il composto 1 (Curcumina-Bodipy), è stato solubilizzato in acetonitrile, quindi come controllo sono state incluse le condizioni in cui le cellule sono state trattate con le rispettive concentrazioni di acetonitrile. Al termine del trattamento di 24 ore è stato aspirato il terreno da ciascun pozzetto, eseguito un lavaggio con PBS 1X pH 7.4 e aggiunti 100 μl di terreno completo. Sono stati quindi aggiunti 20 μl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37°C e al 5% di CO_2 , per un periodo di tempo compreso fra 1 h e 4 h. È stata effettuata la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule vitali. La percentuale di cellule vitali è stata quindi

determinata tramite la seguente formula, considerando come 100% l'assorbanza del controllo non trattato:

$$\% \text{ vitalità} = \frac{(\text{media Abs 490 nm campione} - \text{media Abs 490 nm bianco})}{(\text{media Abs 490 nm controllo} - \text{media Abs 490 nm bianco})} \times 100$$

Dove per bianco si intende l'Abs a 490 nm del solo terreno di coltura. Ciascuna condizione è stata testata in triplicato e i risultati finali, media di due esperimenti, sono stati espressi come percentuale di cellule vitali.

6.3.4 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa e Raw 264.7 dopo trattamento con Cytochalasin D, Nocodazole, Chlorpromazine hydrochloride e Sodium azide

Le cellule HeLa e Raw 264.7 sono state seminate a una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto su piastre da 96 pozzetti e incubate per una notte a 37° C in 5% di CO₂. Il giorno seguente, al fine di scegliere la concentrazione ottimale dei farmaci da utilizzare per i saggi di inibizione, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di *Cytochalasin D*, *Nocodazole*, *Chlorpromazine hydrochloride* e *Sodium azide* NaN₃, secondo lo schema indicato in tabella 4 e incubate per 2 h 30' a 37° C+5% CO₂. Poiché gli inibitori *Cytochalasin D* e *Nocodazole* sono stati solubilizzati in DMSO, in ciascun esperimento come controllo sono state incluse le condizioni in cui le cellule sono state trattate con le rispettive concentrazioni di DMSO.

Concentrazioni inibitori			
[Cythocalasin D]	[Nocodazole]	[Chlorpromazine H]	Sodium azide
5 µM	5 µM	5 µg/ml	0,005 %
10 µM	10 µM	10 µg/ml	0,05 %
20 µM	20 µM	20 µg/ml	-
DMSO			
0,125%	0,075%		
0,25%	0,15%		
0,5%	0,3%		

Tabella 4. Schema delle concentrazioni relative a *Cythocalasin D*, *Nocodazole*, *Chlorpromazine H* e *Sodium azide* per il saggio di vitalità cellulare su cellule HeLa e Raw 264.7.

Terminato il trattamento con gli inibitori è stato aspirato il terreno da ciascun pozzetto, eseguito un lavaggio con PBS 1X pH 7.4 e aggiunti 100 µl di terreno completo. Sono stati quindi aggiunti 20 µl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37° C e al 5% di CO₂, per un periodo di tempo compreso fra 1 h e 4 h. È stata effettuata la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule vitali. La percentuale di cellule vitali è stata quindi determinata tramite la seguente formula, assumendo come 100% l'assorbanza del controllo non trattato:

$$\% \text{ vitalità} = \frac{(\text{media Abs 490 nm campione} - \text{media Abs 490 nm bianco})}{(\text{media Abs 490 nm controllo} - \text{media Abs 490 nm bianco})} \times 100$$

Dove per bianco si intende l'Abs a 490nm del solo terreno di coltura. Ciascuna condizione è stata testata in triplicato e i risultati finali, media di due esperimenti, sono stati espressi come percentuale di cellule vitali.

6.3.5 Inibizione dei pathways di internalizzazione

Le cellule HeLa sono state seminate a una densità di 2×10^4 cellule per pozzetto in chamber slide e incubate per 24 h a 37°C in 5% di CO_2 . Il giorno successivo, le cellule sono state pre-trattate per 2 h 30' con *Chlorpromazine h* [10 $\mu\text{g/ml}$], *Cytochalasin D* [10 μM] e *Sodium azide* 0,005%. Terminato il trattamento, le cellule sono state lavate con tampone fosfato salino 1X (PBS-1X) e quindi è stato aggiunto HNT/1 [88 $\mu\text{g/ml}$] e sono state incubate per 24 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Le cellule Raw 264.7 sono state seminate a una densità di 2×10^4 cellule per pozzetto in chamber slide e incubate per 24 h a 37°C in 5% di CO_2 . Successivamente, le cellule sono state pre-trattate per 2 h 30' con *Chlorpromazine h* [10 $\mu\text{g/ml}$], *Cytochalasin D* [10 μM], *Nocodazole* [10 μM] e *Sodium azide* 0,005%. Una volta terminato il trattamento, le cellule sono state lavate con PBS-1X e quindi è stato aggiunto HNT/1 [88 $\mu\text{g} / \text{ml}$] e sono state incubate per 4 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$.

6.3.6 Microscopia a fluorescenza

Terminato il trattamento con HNT/1 [88 $\mu\text{g/ml}$] per entrambe le linee cellulari, è stato aspirato il terreno e le cellule sono state lavate 3 volte con PBS-1X pH 7.4 per allontanare il composto non internalizzato e fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti. Dopo questo passaggio le cellule sono state nuovamente lavate 3 volte con PBS-1X pH 7.4 e i nuclei sono stati colorati con il colorante nucleare Hoechst 33342 [1 $\mu\text{g/ml}$] per 20 minuti. Dopo la colorazione nucleare, le cellule sono state ulteriormente lavate 3 volte con PBS-1X pH 7.4 e il vetrino è stato osservato al microscopio a fluorescenza (Leica microsystems) utilizzando i filtri DAPI (per evidenziare i nuclei) e FITC (per evidenziare HNT/1). Le cellule non pre-trattate con gli inibitori e incubate con HNT/1 [88 $\mu\text{g/ml}$] e con HNT *pristine* [88 $\mu\text{g/ml}$] sono state utilizzate come controllo. Per analizzare il numero di nanoparticelle internalizzate nelle diverse condizioni, è stato utilizzato il software “ImageJ”, che ci ha permesso di analizzare la fluorescenza data da HNT/1 all'interno delle cellule in seguito ai trattamenti

con i vari farmaci inibitori, rispetto al controllo. Nello specifico per ogni condizione sono stati analizzati sei campi differenti con numero di nuclei paragonabili ed è stato contato il numero di particelle internalizzate. Dopo aver ottenuto il numero di nuclei e il numero di particelle internalizzate, è stato calcolato il rapporto $N^{\circ} \text{ nuclei} / N^{\circ} \text{ particelle}$, per ogni campo preso in considerazione, e calcolato poi il valore medio.

6.3.7 Test di emocompatibilità

Al fine di valutare l'interazione del nanomateriale con il sangue umano, il sangue fresco è stato prelevato da 12 soggetti sani (6 donne e 6 uomini) e raccolto in provette Vacutainer, le cui pareti sono trattate con acido etilendiamminicotetracetico (EDTA). Subito dopo il prelievo 5 ml di sangue per ciascun soggetto, sono stati diluiti con 10 ml di PBS 1X pH 7.4 e sono stati centrifugati (1000 xg) per 20 minuti. È stato eliminato il sovrnatante e questo passaggio è stato ripetuto per 3 volte, per rimuovere completamente il siero e ottenere così i globuli rossi (RBCs). Dopo aver ottenuto i globuli rossi questi sono stati diluiti (1:5) con PBS 1X pH 7.4. Successivamente 250 μ l dei globuli rossi diluiti sono stati incubati per 12 ore a 37° C con differenti concentrazioni di HNT, Curcumina-Bodipy [1], HNT/1 e acetonitrile secondo quanto riportato in tabella 5. L'acetonitrile è stato inserito come controllo in quanto rappresenta il solvente del composto 1. Il controllo negativo è costituito da PBS 1X pH 7.4 e il controllo positivo (100% emolisi) da acqua.

Emocompatibilità			
[HNT]	Curcumina-Bodipy [1]	[HNT/1]	[Acetonitrile]
[200 μ g/ml]	[20 μ M]	[200 μ g/ml]	2,9 %
[100 μ g/ml]	[10 μ M]	[100 μ g/ml]	1,45 %
[50 μ g/ml]	[5 μ M]	[50 μ g/ml]	0,72 %
[20 μ g/ml]	[2 μ M]	[20 μ g/ml]	0,29 %
[10 μ g/ml]	[1 μ M]	[10 μ g/ml]	0,145 %

Tabella 5. Schema delle concentrazioni relative a HNT, Curcumina-Bodipy [1], HNT/1 e acetonitrile utilizzate per testare l'emocompatibilità di HNT/1

Al termine delle 12 h di incubazione, i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti (1000xg) a 4° C e sono stati letti i valori di assorbanza a 560 nm del surnatante. Ciascuna condizione è stata fatta in triplicato. La percentuale di emolisi è stata poi calcolata come segue.

$$\text{Hemolysis ratio (\%)} = \frac{\text{Abs campione} - \text{Abs controllo negativo}}{\text{Abs controllo positivo} - \text{Abs controllo negativo}} \times 100$$

6.4 Sistema ibrido HNT/KGN/Lap

6.4.1 Caricamento della Kartogenina (KGN) sui nanotubi.

Ad una dispersione di HNT *pristine* (p-HNT) in acqua deionizzata (5ml) è stato aggiunto 1 ml di KGN 10^{-2} M in CHCl_3 . La dispersione ottenuta è stata sonicata per 5 minuti, ad una potenza di 200 W e a 25 °C, successivamente è stata sottoposta a 3 cicli di vuoto per aumentare il caricamento e lasciata in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. La polvere è stata poi lavata con acqua e quindi essiccata a 60° C sotto vuoto. L'efficienza di caricamento è stata calcolata in base alla concentrazione di partenza della KGN e in base alla concentrazione di molecola non caricata, quantificata mediante spettrofotometria UV-vis a lunghezza d'onda di 261 nm.

6.4.2 Preparazione dei gels

I gel puri sono stati preparati pesando in una fiala con tappo a vite (diametro 1,5 cm) laponite e solvente (~ 1 g). La miscela è stata prima dispersa per 5 minuti con irradiazione ad ultrasuoni e lasciata a temperatura ambiente fino alla formazione del gel. I gel ibridi sono stati preparati pesando in una fiala con tappo a vite (diametro 1,5 cm) la quantità di laponite, halloysite e solvente (~ 1 g). La miscela è stata prima dispersa per 5 minuti con irradiazione ad ultrasuoni, e lasciata poi a temperatura ambiente fino alla formazione del gel.

6.4.3 Estrazione del liquido sinoviale

I campioni di liquido sinoviale sono stati estratti asetticamente, sotto guida ecografica, dall'articolazione del ginocchio di quattro pazienti con osteoartrite. Tutti i soggetti partecipanti hanno firmato il consenso informato.

6.4.4 Cinetica di rilascio

Il rilascio di KGN dagli ibridi HNT/KGN è stato valutato come segue: 20 mg del campione sono stati dispersi in tampone fosfato pH 7,4 (1 ml) e trasferiti in una membrana da dialisi con diametro di 21,5 mm. La membrana è stata quindi posta in agitazione in un pallone contenente 9 ml del mezzo di rilascio a 37° C. A intervalli regolari è stato prelevato ed analizzato 1 ml del mezzo di rilascio. Affinché il volume del mezzo di rilascio rimanesse costante è stato aggiunto di volta in volta 1 ml di soluzione fresca per sostituire il volume prelevato.

6.4.5 Rilascio di KGN dal gel

I gel ibridi in PBS contenenti rispettivamente il 2 e il 5 % in peso di laponite e HNT/KGN ($[KGN]=1,13 \times 10^{-3} \text{ M}$) sono stati preparati, come descritto in precedenza, in un volume finale di 5 ml. In seguito 5 ml del mezzo di rilascio sono stati posti sul gel e la cinetica di rilascio è stata valutata a 37° C. Ad intervalli di tempo regolari sono stati prelevati 250 µL di sopranatante per le letture allo spettrofotometro, controllando il picco di assorbimento della KGN a 261 nm. Per mantenere costante il volume sono stati contemporaneamente aggiunti 250 µL dello stesso solvente pre-riscaldato a 37° C.

6.4.6 Calcolo della concentrazione di KGN rilasciata

La concentrazione di KGN in soluzione è stata determinata mediante spettrofotometria UV-vis ($\lambda = 271 \text{ nm}$) utilizzando la legge di Lambert-Beer. La quantità totale di farmaco rilasciato (F_t) è stata calcolata come segue:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i$$

dove V_m e C_t sono il volume e la concentrazione del farmaco al tempo t . V_a è il volume del campione prelevato e C_i è la concentrazione del farmaco al tempo i ($i < t$).

6.4.7 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule Hep-G2 e MC3T3-E1 dopo trattamento con HNT/KGN

Per testare la biocompatibilità degli ibridi HNT/Lap e HNT/KGN/Lap, le cellule (HepG2, MC3T3-E1) sono state piastrate ad una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto in piastra da 96 con i rispettivi terreni di coltura ed incubate *overnight* a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Il giorno seguente è stato aspirato il terreno e sono state trattate con concentrazioni crescenti di HNT/Lap e HNT/KGN/Lap secondo la tabella 6 e incubate per 48 e 72 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Al termine dei trattamenti (48 e 72 h) è stato aspirato il terreno da ciascun pozzetto, eseguito un lavaggio con PBS 1X pH 7.4 e aggiunti 100 μl di terreno completo. Sono stati quindi aggiunti 20 μl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37°C e al 5% di CO_2 , per un periodo di tempo compreso fra 1 h e 4 h. È stata effettuata la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule vitali.

Concentrazioni HNT/Lap			
	[HNT]	[Laponite]	
HNT/Lap	1 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	
HNT/Lap	10 $\mu\text{g/m}$	200 $\mu\text{g/ml}$	
HNT/Lap	50 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	
HNT/Lap	100 $\mu\text{g/ml}$	2000 $\mu\text{g/ml}$	

Concentrazioni HNT/KGN/Lap			
	[HNT]	[KGN]	[Laponite]
HNT/KGN/Lap	1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 μM	20 $\mu\text{g/ml}$
HNT/KGN/Lap	10 $\mu\text{g/m}$	1 μM	200 $\mu\text{g/ml}$
HNT/KGN/Lap	50 $\mu\text{g/ml}$	5 μM	1000 $\mu\text{g/ml}$
HNT/KGN/Lap	100 $\mu\text{g/ml}$	10 μM	2000 $\mu\text{g/ml}$

Tabella 6. Schema delle concentrazioni relative a HNT, KGN, Lap per il saggio di vitalità cellulare su cellule HepG2 e MC3T3-E1.

La percentuale di cellule vitali è stata quindi determinata tramite la seguente formula, assumendo come 100% l'assorbanza del controllo non trattato:

$$\% \text{ vitalità} = \frac{(\text{media Abs 490 nm campione} - \text{media Abs 490 nm bianco})}{(\text{media Abs 490 nm controllo} - \text{media Abs 490 nm bianco})} \times 100$$

Dove per bianco si intende l'Abs a 490nm del solo terreno di coltura. Ciascuna condizione è stata testata in triplicato e i risultati finali, media di due esperimenti, sono stati espressi come percentuale di cellule vitali.

6.5 Sistema ibrido HNT-CDs

6.5.1 Sintesi HNT-NH₂

4 g di 3-azidopropyl trimethoxysilane sono stati sciolti in 60 mL di toluene anidro e sono stati aggiunti 2 g di polvere di HNTs. La sospensione ottenuta è stata dispersa per 15 minuti con radiazione a ultrasuoni e quindi lasciata in agitazione per 48 h. Successivamente, il solido grezzo è stato filtrato, lavato con CH₂Cl₂ e CH₃OH ed essiccato per una notte a 80° C sotto vuoto. Il nanomateriale così ottenuto è stato risospeso in DMF e alla miscela di reazione è stata aggiunta la trifenilfosfina (PPh₃). La dispersione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1 h. Successivamente è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione acquosa di NH₃ (2 mL). Dopo 5 giorni il solvente è stato filtrato e la polvere è stata lavata più volte con CH₂Cl₂ ed infine essiccata a 50° C sotto vuoto.

6.5.2 Sintesi composto 1

L'acido tartarico (140 mg, 10 eq) è stato sospeso in 15 mL di CH₂Cl₂ ed è stato aggiunto N, N-dicicloesilcarbodiimmide (88 mg, 10 eq.). La sospensione ottenuta è stata posta in agitazione sotto atmosfera di argon, a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente è stato rapidamente aggiunto HNT-NH₂ (500 mg). La miscela è stata lasciata in agitazione per 48 h. Quindi, il solvente è stato filtrato, la polvere è stata risciacquata con H₂O e successivamente con CH₂Cl₂, ed infine essiccata a 80° C sotto vuoto.

6.5.3 Sintesi CDs

I CDs passivati con ammine sono stati sintetizzati con un metodo di pirolisi assistito da microonde. 0,250 g di acido tartarico sono stati sciolti in 300 µL di acqua e 0,100 g di EDA e una quantità catalitica di TEA sotto agitazione. La miscela è stata riscaldata a 240° C per 3 min, durante i quali la soluzione incolore è cambiata in un solido rosso-marrone, indicando

la formazione di CD passivati con ammine. Il solido risultante è stato sciolto in una quantità minima di acqua distillata. La soluzione acquosa è stata quindi precipitata e lavata più volte con etanolo anidro in eccesso per rimuovere i residui solubili. I CDs purificati sono stati quindi essiccati sotto vuoto a 50° C.

6.5.4 Sintesi HNT-CDs

I HNT-CDs sono stati ottenuti mediante irradiazione a microonde di una soluzione acquosa del composto 1 e di etilenendiammina (EDA) (1:1 mol/mol). Il composto 1 (65 mg), EDA (100 µL) e acqua (300 µL) sono stati riscaldati a 240° C, 200 W (valore impostato) per 3 minuti in presenza di una quantità catalitica di TEA. Nel processo di riscaldamento a microonde, la soluzione cambia colore da bianco a giallo come risultato della formazione dei carbon dots sulla superficie esterna dei nanotubi di halloysite. Trascorso questo tempo, la polvere è stata raccolta e sciacquata più volte con etanolo anidro per eliminare le reazioni collaterali, ed essiccata a 80° C sotto vuoto.

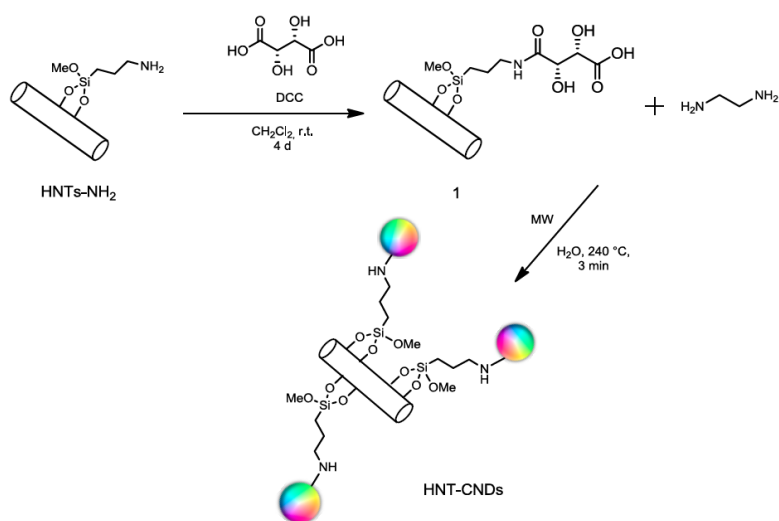


Figura 65. Schema sintesi HNT-CDs

6.5.5 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa per testare la citocompatibilità di HNT-CDs

Per testare la biocompatibilità dell'ibrido HNT-CDs, le cellule HeLa sono state piastrate ad una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto in piastra da 96 con RPMI 5% FBS +P/S 1X ed incubate *overnight* a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Il giorno seguente è stato aspirato il terreno e sono state trattate con concentrazioni crescenti di HNT-CDs secondo lo schema a seguire e incubate per 24 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$.

Concentrazioni [HNT-CDs]	
HNT-CDs	1 mg/ml
HNT-CDs	2,5 mg/ml
HNT-CDs	3 mg/ml
HNT-CDs	6,5 mg/ml
HNT-CDs	15 mg/ml
HNT-CDs	30 mg/ml

Tabella 7. Schema delle concentrazioni relative a HNT-CDs per il saggio di vitalità cellulare su cellule HeLa.

Al termine del trattamento di 24 h è stato aspirato il terreno da ciascun pozzetto, eseguito un lavaggio con PBS 1X pH 7.4 e aggiunti 100 μl di terreno completo. Sono stati quindi aggiunti 20 μl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37°C e al 5% di CO_2 , per un periodo di tempo compreso fra 1h e 4h. È stata effettuata la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule vitali. La percentuale di cellule vitali è stata quindi determinata tramite la seguente formula, assumendo come 100% l'assorbanza del controllo non trattato:

$$\% \text{ vitalità} = \frac{(\text{media Abs 490 nm campione} - \text{media Abs 490 nm bianco})}{(\text{media Abs 490 nm controllo} - \text{media Abs 490 nm bianco})} \times 100$$

Dove per bianco si intende l'Abs a 490nm del solo terreno di coltura. Ciascuna condizione è stata testata in triplicato e i risultati finali, media di due esperimenti, sono stati espressi come percentuale di cellule vitali.

6.5.6 Saggio di vitalità cellulare MTS su cellule HeLa per testare le capacità antiossidanti di HNT-CDs

Le cellule HeLa sono state seminate a una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto su piastre da 96 pozzetti e incubate per una notte a 37° C in 5% di CO₂. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate con perossido di idrogeno H₂O₂ [100 µM] per avere una concentrazione inibente del 50% (IC50). Allo stesso tempo sono state trattate con diverse concentrazioni di HNT-CDs comprese tra 0,04 mg/ml e 1 mg/ml (concentrazioni riferite ai CDs). Inoltre le cellule sono state trattate anche con N-acetilcisteina (NAC) 2 mM come controllo dell'attività antiossidante e incubate per 24 h a 37° C+5% CO₂. Terminato il trattamento è stato aspirato il terreno da ciascun pozzetto, eseguito un lavaggio con PBS 1X pH 7.4 e aggiunti 100 µl di terreno completo. Sono stati quindi aggiunti 20 µl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37° C e al 5% di CO₂, per un periodo di tempo compreso fra 1h e 4h. È stata effettuata la lettura dei valori di assorbanza a 490 nm, che sono direttamente proporzionali al numero di cellule vitali. La percentuale di cellule vitali è stata quindi determinata tramite la seguente formula, assumendo come 100% l'assorbanza del controllo non trattato:

$$\% \text{ vitalità} = \frac{(\text{media Abs 490 nm campione} - \text{media Abs 490 nm bianco})}{(\text{media Abs 490 nm controllo} - \text{media Abs 490 nm bianco})} \times 100$$

Dove per bianco si intende l'Abs a 490nm del solo terreno di coltura. Ciascuna condizione è stata testata in triplicato e i risultati finali, media di due esperimenti, sono stati espressi come percentuale di cellule vitali.

6.5.7 Microscopia a fluorescenza per valutare le proprietà fotoluminescenti dei CDs e l'internalizzazione del composito HNT-CDs

Le cellule HeLa sono state seminate a una densità di 2×10^4 cellule per pozzetto in chamber slide e incubate per 24 ore a 37°C in 5% di CO_2 . Il giorno successivo le cellule sono state trattate per 24 ore con differenti concentrazioni di CDs (5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$). Terminato il trattamento, le cellule sono state lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 per allontanare i CDs non internalizzati e fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti. Dopo questo passaggio le cellule sono state nuovamente lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 e i nuclei sono stati colorati con il colorante nucleare Hoechst 33342 [1 $\mu\text{g/ml}$] per 20 minuti. Dopo la colorazione nucleare, le cellule sono state ulteriormente lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 e il vetrino è stato osservato al microscopio a fluorescenza utilizzando i filtri DAPI (per osservare i nuclei), FITC e Cy5.5 (per osservare i CDs). Allo stesso modo, per valutare l'internalizzazione del composito HNT-CDs cellule HeLa sono state seminate a una densità di 2×10^4 cellule per pozzetto in chamber slide e incubate per 24 ore a 37°C in 5% di CO_2 . Il giorno successivo le cellule sono state trattate per 24 ore con differenti concentrazioni di HNT-CDs (0,16 mg/ml e 0,32 mg/ml). Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 per allontanare i HNTs-CDs non internalizzati e fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti. Dopo questo passaggio le cellule sono state nuovamente lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 e i nuclei sono stati colorati con il colorante nucleare Hoechst 33342 [1 $\mu\text{g/ml}$] per 20 minuti. Dopo la colorazione nucleare, le cellule sono state ulteriormente lavate (x3) con PBS-1X pH 7.4 e il vetrino è stato osservato al microscopio a fluorescenza utilizzando i filtri DAPI (per osservare i nuclei), FITC e Cy5.5 (per osservare HNT-CDs).

6.5.8 Analisi citofluorimetrica

Per l'analisi citofluorimetrica le cellule HeLa sono state seminate su piastre da sei pozzetti ad una densità di $2,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto in un volume finale di 3 ml in RPMI 5%FBS +P/S 1X e incubate per 24 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Il giorno seguente sono state trattate con HNT-CDs ([0,32 mg/ml]) ed incubate per 30 minuti, 2 h, 4 h e 24 h a $37^\circ \text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Dopo ciascun periodo di incubazione le cellule sono state lavate con PBS-1X pH 7.4, raccolte in tubi per citofluorimetria e centrifugate per 5 minuti. È stato eliminato il sovrnatante, le cellule sono state lavate con PBS-1X pH 7.4 e centrifugate nuovamente per 5 minuti. Dopo aver eliminato il sovrnatante, il pellet cellulare è stato risospeso in FACS buffer (0.5% BSA + 0.05% NaN_3). Come controllo oltre alle cellule non trattate con HNT-CDs è stata presa in considerazione la condizione in cui le cellule sono state trattate con HNT pristine [0,32 mg/ml]. Ciascuna condizione è stata testata in doppio. Per ogni campione sono stati presi in considerazione 1×10^4 eventi utilizzando i canali FL-1 ed FL-2 e considerando i parametri FSC (forward scatter - dispersione frontale) e SSC (side scatter - dispersione laterale). I dati sono stati elaborati usando il software WinMDI.

Bibliografia

- Abbasi E., Kafshdooz T., Bakhtiary M., Nikzamir N., Nikzamir N., Nikzamir M, Mohammadian M., Akbarzadeh A. "Biomedical and biological applications of quantum dots". *Artif Cells Nanomed Biotechnol.*, 2016, 44, 885–891.
- Abdullayev E., Abbasov V., Tursunbayeva A., Portnov V., Ibrahimov H., Mukhtarova G., Lvov Y. "Self-Healing Coatings Based on Halloysite Clay Polymer Composites for Protection of Copper Alloys". *Applied Materials & Interfaces*, 2013a, 5, 4464–4471.
- Abdullayev E., Lvov Y. "Halloysite clay nanotubes as a ceramic "skeleton" for functional biopolymer composites with sustained drug release". *J Mater Chem B*, 2013b, 1, 2894–2903.
- Aderem A., Underhill D.M. "Mechanisms of phagocytosis in macrophage". *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, 17, 593–623.
- Aguzzi C., Cerezo P., Viseras C., Caramella C. "Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations". *Appl. Clay Sci.*, 2007, 36, 22–36.
- Ahmed F.R., Shoaib M.H., Azhar M. Um S.H., Yousuf R.I., Hashmi S., Dar A. "In vitro assessment of cytotoxicity of halloysite nanotubes against HepG2, HCT116 and human peripheral blood lymphocytes". *Colloid Surf B.*, 2015, 135, 50–55.
- Albanese A., Tang P.S., Chan W.C. "The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems". *Annu Rev Biomed Eng.*, 2012, 14, 1–16.
- Al-Jamal K.T., Nerl H., Müller K.H., Ali-Boucetta H., Li S., Haynes P.D., Jinschek J.R., Prato M., Bianco A., Kostarelos K., Porter A.E. "Cellular uptake mechanisms of functionalised multi-walled carbon nanotubes by 3D electron tomography imaging". *Nanoscale*, 2011, 3, 2627–2635.
- Allen L.A., Aderem A. "Mechanisms of phagocytosis". *Current Opinion in Immunol.*, 1996, 8, 36–40.
- Allhoff F. "On the Autonomy and Justification of Nanoethics". *Nanoethics*, 2007, 1, 185–210.
- Anand P., Kunnumakkara A.B, Newman R.A., Aggarwal B.B. "Bioavailability of curcumin: problems and promises". *Mol. Pharm.*, 2007, 4, 807–818.
- Ariga K., Ji Q., McShane M.J., Lvov Y.M., Vinu A., Hill J.P. "Inorganic nanoarchitectonics for biological applications". *Chem. Mater.*, 2012, 24, 728–737.
- Atrooz O.M. "Effects of alkylresorcinolic lipids obtained from acetonc extract of Jordanian wheat grains on liposome properties". *Int J Biol Chem.*, 2011, 5, 314–321.
- Auffan M., Achouak W., Rose J., Roncato M.A., Chanéac C., Waite D.T., Masion A., Woicik J.C., Wiesner M.R., Bottero J.Y. "Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli". *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42, 6730–6735.

- Avitabile E., Bedognetti D., Ciofani G., Bianco A., Delogu L.G. “How can nanotechnology help the fight against breast cancer?”. *Nanoscale*, 2018, *10*, 11719–11731.
- Baek M., Lee A.J., Choi S.J. “Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo”. *Mol Cell Toxicol.*, 2012, *8*, 95–101.
- Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T., Cordani M., Rizzolio F. “The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine”. *Molecules* 2020, *25*, 112.
- Bazak R., Hourri M., Achy S. E., Hussein W., Refaat T. “Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature”. *Mol Clin Oncol.*, 2014, *2*, 904–908.
- Bellani L., Giorgetti L., Riela S., Lazzara G., Scialabba A., Massaro M. “Ecotoxicity of halloysite nanotube-supported palladium nanoparticles in *Raphanus sativus*”. *L. Environ. Toxicol.*, 2016, *35*, 2503–2510.
- Bergaya F., Lagaly G. “General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science”. *Developments in Clay Science*; Elsevier: Oxford, UK, 2006; Chapter 1; pp. 1–18.
- Blanco E., Shen H., Ferrari M. “Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery”. *Nat Biotechnol.*, 2015, *33*, 941–951.
- Boyer C., Figueiredo L., Pace R., Lesoeur J., Rouillon T., Visage C.L., Tassin J.F., Weiss P., Guicheux J., Rethore G. “Laponite Nanoparticle-Associated Silated Hydroxypropylmethyl Cellulose as an Injectable Reinforced Interpenetrating Network Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering”. *Acta Biomater.*, 2018, *65*, 112–122.
- Brandelli A. “Toxicity and Safety Evaluation of Nanoclays. Nanomaterials: Ecotoxicity, Safety, and Public Perception”. 2018, 57–76.
- Bretti C., Cataldo S., Gianguzza A. Lando G., Lazzara G., Pettignano A., Sammartano S. “Thermodynamics of proton binding of halloysite nanotubes”. *J. Phys. Chem. C*, 2016, *120*, 7849–7859.
- Cao Y., Luo Y. “Pharmacological and Toxicological Aspects of Carbon Nanotubes (CNTs) to Vascular System: A Review”. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 385, 114801.

- Carretero M.I. "Clay Minerals and Their Beneficial Effects Upon Human Health: A Review". *Appl. Clay Sci.* 2002, 21, 155–163.
- Castro-Smirnov F.A., Ayache J., Bertrand J.R., Dardillac E., Le Cam E., Piétrement O., Aranda P., Ruiz-Hitzky E., Lopez B.S. "Cellular uptake pathways of sepiolite nanofibers and DNA transfection improvement". *Sci. Rep.*, 2017, 7, 5586.
- Cataldo S., Lazzara G., Massaro M., Muratore M., Pettignano A., Riela S. "Functionalized halloysite nanotubes for enhanced removal of lead(II) ions from aqueous solutions". *Appl. Clay Sci.*, 2018, 156, 87.
- Cavallaro G., Lazzara G., Massaro M., Milioto S., Noto R., Parisi F., Riela S. "Biocompatible Poly(*N*-isopropylacrylamide)-halloysite Nanotubes for Thermoresponsive Curcumin Release". *J. Phys. Chem. C*, 2015, 119, 8944-8951.
- Charlier E., Deroyer C., Ciregia F. Malaise O., Neuville S., Plener Z., Malaise M., de Seny D. "Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)". *Biochemical Pharmacology*, 2019, 165, 49-65.
- Cheng C., Song W., Zhao Q., Zhang H. "Halloysite nanotubes in polymer science: purification, characterization, modification and applications". *Nanotechnology Reviews*, 2020, 9, 323-344.
- Churchman G., Whitton J.S., Claridge G.G.C., Theng K.G. "Intercalation method using formamide for differentiating halloysite from kaolinite". *Clays and Clay Minerals*, 1984, 32, 241-248.
- Churchman G., Carr R.M. "The Definition and Nomenclature of Halloysites". *Clays Clay Miner.*, 1975, 23, 382–388.
- Cole N.B., Lippincott-Schwartz J. "Organization of organelles and membrane traffic by microtubules". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995, 7, 55-64.
- Conner S.D., Schmid S.L. "Regulated portals of entry into the cell". *Nature*, 2003, 6, 37-44.
- Cook J.A., Gius D., Wink D.A., Krishna M.C., Russo A., Mitchell J.B. "Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment". *Semin Radiat Oncol.*, 2004, 14, 259-66.
- Cooper J.A. "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin". *J Cell Biol.*, 1987, 105, 1473-1478.

- Cring M.R., Sheffield V.C. “Gene therapy and gene correction: targets, progress, and challenges for treating human diseases”. *Gene Ther.*, 2020.
- Cullen R.T., Searl A., Miller B.G., Davis J.M., Jones A.D. “Pulmonary and intraperitoneal inflammation induced by cellulose fibres”. *J. Appl. Toxicol.*, 2000, 20, 49-60.
- Danyliuk N., Tomaszewska J., Tatarchuk T. “Halloysite nanotubes and halloysite-based composites for environmental and biomedical applications”. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 309, 113077.
- De Jong W.H., Hagens W. I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma R.E. “Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration”. *Biomaterials*, 2008, 29, 1912–1919.
- De Oliveira M.T.G., Furtado S.M.A., Formoso M.L.L., Eggleton R.A., Dani R. “Coexistence of halloysite and kaolinite - a study on the genesis of kaolin clays of Campo Alegre Basin, Santa Catarina State, Brazil”. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 2007, 79, 665-681.
- Dionisi C., Hanafy N., Nobile C. De Giorgi L., Rinaldi R., Casciaro S., Lvov Y.M., Leporatti S. “Halloysite clay nanotubes as carriers for curcumin: characterization and application”. *IEEE Trans. Nanotechnol.*, 2016, 15, 720–724.
- Dombu C.Y., Kroubi M., Zibouche R. Matran R., Betbeder D. “Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells”. *Nanotechnology*, 2010, 21, 355102.
- Dong J., Ma. Q. “Myofibroblasts and Lung Fibrosis Induced by Carbon Nanotube Exposure”. *Particle and Fibre Toxicology*, 2016, 13, 60.
- Drexler E. “Engines of creation: the coming era of nanotechnology”. 1986.
- Du M., Guo B., Jia D. “Newly emerging applications of halloysite nanotubes: a review”. *Polym Int.*, 2010, 59, 574-582.
- Durymanov M., Reineke J. “Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers”. *Front Pharmacol.*, 2018, 9, 971.
- Dutta D., Donaldson J.G. “Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences”. *Cell Logist.*, 2012, 2, 203-208.

- Dzamukova M., Naumenko E., Lvov Y.M., Fakhrullin R.F. "Enzyme-activated intracellular drug delivery with tubule clay nano formulation". *SciReports*, 2015, 5, 10560–10566.
- Elsaesser A., Howard C.V. "Toxicology of nanoparticles". *Adv Drug Deliver Rev.*, 2012, 64, 129-137.
- Ernst R., Ballweg S., Levental I. "Cellular mechanisms of physicochemical membrane homeostasis". *Curr Opin Cell Biol.*, 2018, 53, 44-51.
- Fakhrullin G.I., Akhatova F.S., Lvov Y.M., Fakhrullin R.F. "Toxicity of halloysite clay nanotubes in vivo: a *Caenorhabditis elegans* study". *Environ Sci Nano*, 2015, 2, 54–59.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. "Free radicals, antioxidants, and nutrition". *Nutrition*, 2002, 18, 872-879.
- Farris E., Sanderfer K., Lampe A. Brown D.M., Ramer-Tait A.E., Pannier A.K. "Oral Non-Viral Gene Delivery for Applications in DNA Vaccination and Gene Therapy". *Curr Opin Biomed Eng.*, 2018, 7, 51-57.
- Feynman, R. "There's Plenty of Room at the Bottom - An Invitation to Enter a New Field of Physics". *Engineering and Science* 1960, 23, 22-36.
- Fisher G.B., Ryan P.C. "The smectite-to-disordered kaolinite transition in a tropical soil chronosequence, pacific coast, costa rica". *Clays Clay Miner.*, 2006, 54, 571–586.
- Fornaguera C., Solans C. "Methods for the *In Vitro* Characterization of Nanomedicines-Biological Component Interaction". *J Pers Med.*, 2017, 7, 2.
- Foroozandeh, P., Aziz, A.A. "Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles". *Nanoscale Res Lett.*, 2018, 13, 339.
- Ganoth A., Merimi K. C., Peer D. "Overcoming multidrug resistance with nanomedicines". *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2014, 12, 223–238.
- Gao Z., Zhang L., Sun Y. "Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance". *J Control Release.*, 2012, 162, 45-55.
- Gattoo M. A., Naseem S., Arfat M.Y., Dar A.M., Qasim K., Zubair S. "Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations". *BioMed Research International*, 2014.

- Gaucher G., Dufresne M., Sant V.P., Kang N., Maysinger D., Leroux J.C. “Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery”. *Journal of Controlled Release*, 2005, *109*, 169–188.
- Gehr P. “Interaction of nanoparticles with biological systems”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, *172*, 395-399.
- Gerwin N., Hops C., Lucke A. “Intraarticular drug delivery in osteoarthritis”. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006, *58*, 226-242.
- Gnach A., Lipinski T., Bednarkiewicz A., Rybka J., Capobianco J.A. “Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity”. *Chem. Soc. Rev.* 2015, *44*, 1561–1584.
- Goddard III, W. (Ed.), Brenner, D. (Ed.), Lyshevski, S. (Ed.), Iafrate, G. (Ed.). “Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology”. *Boca Raton: CRC Press*, 2012.
- Gribble F.M., Ashfield R., Ammala C., Ashcroft F.M. “Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes”. *J. Physiol.*, 1997, *498*, 87-98.
- Grim R.E. “Applied Clay Mineralogy”. McGraw-Hill, 1962, 422pp.
- Grim R.E. “Modern concepts of clay materials”. *J. Geol.*, 1950, *50*, 225–275.
- Groves E., Dart A.E., Covarelli V., Caron E. “Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells”. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, *65*, 1957–1976.
- Guerrini L., Alvarez-Puebla R.A., Pazos-Perez N. “Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids”. *Materials*, 2018, *11*, 1154-1182.
- Guillouzo A., Corlu A., Aninat C., Glaise D., Morel F., Guguen-Guillouzo C. “The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics”. *Chem Biol Interact.*, 2007, *168*, 66-73.
- Guimaraes L., Enyashin A.N., Seifert G., Duarte H.A. “Structural, electronic, and mechanical properties of single-walled halloysite nanotube models”. *J Chem Phys.*, 2010, *114*, 11358–11363.
- Harvey J., Hardy S.C., Ashford M.L.J. “Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on KATP channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line”. *British Journal of Pharmacology*, 1999, *126*, 51-60.

- Hauck T.S., Ghazani A.A., Chan W.C.W. “Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells”. *Small*, 2008, 4, 153–159.
- Hillaireau H., Couvreur P. “Nanocarriers’ entry into the cell: relevance to drug delivery”. *Cell Mol Life Sci.*, 2009, 66, 2873–2896.
- Hillier S., Ryan P.C. “Identification of halloysite (7Å) by ethylene glycol solvation: the ‘MacEwan effect’”. *Clay Miner.*, 2002, 37, 487–496.
- Hoebeke J., Van Nijen G., De Brabander M. “Interaction of nocodazole (R 17934), a new anti-tumoral drug, with rat brain tubulin”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 319–324.
- Howes M.T., Mayor S., Parton R.G. “Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis”. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010, 22, 519–527.
- Hu Q., Ding B., Yan X. Peng L., Duan J., Yang S., Cheng L., Chen D. “Polyethylene Glycol Modified Pamam Dendrimer Delivery of Kartogenin to Induce Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells”. *Nanomedicine*, 2017, 13, 2189–2198.
- Huang Y.C., Vieira A., Huang K.L., Yeh M.K., Chiang C.H. “Pulmonary inflammation caused by chitosan microparticles”. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2005, 75, 283–287.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. “*In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells”. *Toxicol. In Vitro*, 2005, 19, 975–983.
- Huynh C.T., Lee D.S. (2015) “Controlled Release”. In: Kobayashi S., Müllen K. (eds) *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Iannitti T., Lodi D., Palmieri B. “Intra-articular injections for the treatment of osteoarthritis: focus on the clinical use of hyaluronic acid”. *Drugs R D.*, 2011, 11, 13–27.
- Ibarguren C., Naranjo P.M., Stötzl C., Audisio M.C., Shama E.L., Farfán Torres E.M., Müller F.A. “Adsorption of nisin on raw montmorillonite”. *Appl Clay Sci.*, 2014, 90, 88–95.
- Im G. I. “Application of Kartogenin for Musculoskeletal Regeneration”. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2018, 106, 1141–1148.

- Isoda K., Nagata R., Hasegawa T., Taira Y., Taira I., Shimizu Y., Isama K., Nishimura T., Ishida I. "Hepatotoxicity and drug/chemical interaction toxicity of nanoclay particles in mice". *Nanoscale Res Lett.*, 2017, 12, 199.
- Jafarbeglou M., Abdouss M., Shoushtari A.M., Jafarbeglou M. "Clay nanocomposites as engineered drug delivery systems". *RSC Adv.*, 2016, 6, 50002–50016.
- Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. "Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations". *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2018, 9, 1050–1074.
- Johnson K., Zhu S., Tremblay M.S., Payette J.N., Wang J., Bouchez L.C., Meeusen S., Althage A., Cho C.Y., Wu X., Schultz P.G. "A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair". *Science*, 2012, 336, 717–721.
- Joo Y., Sim J.H., Jeon Y., Lee S.U., Sohn D. "Opening and blocking the inner-pores of Halloysite". *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49, 4519–4521.
- Joussein E., Petit S., Churchman J., Theng B., Righi D., Delvaux B. "Halloysite clay minerals- a review". *Clay Minerals*, 2005, 40, 383-426.
- Kam N.W.S., Liu Z., Dai H. "Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway". *Angew Chem Int.*, 2006, 118, 591–595.
- Kamal N., Kochkodan V., Zekri A., Ahzi S. "Polysulfone Membranes Embedded with Halloysites Nanotubes: Preparation and Properties". *Membranes*, 2020, 10, 2-27.
- Kamaliev R.F., Ishmukhametov I.R., Batasheva S.N., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F. "Uptake of halloysite clay nanotubes by human cells: Colourimetric viability tests and microscopy study", *Nano-Structures & Nano-Objects*, 2018, 15, 54-60.
- Kamat J.P., Devasagayam T.P., Priyadarsini K.I., Mohan H. "Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications". *Toxicology*, 2000, 155, 55–61.
- Kanwar R., Rathee J., Salunke D.B., Mehta SK. "Green Nanotechnology-Driven Drug Delivery Assemblies". *ACS Omega* 2019, 4, 8804-8815.
- Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maehata Y., Suzuki A., Maeda T., Baba Y. "Acidic extracellular microenvironment and cancer". *Cancer Cell Int.*, 2013, 13, 89.

- Khodzhaeva V., Makeeva A., Ulyanova V., Zelenikhin P., Evtugyn V., Hardt M., Rozhina E., Lvov Y., Fakhrullin R., Ilinskaya O. "Binase Immobilized on Halloysite Nanotubes Exerts Enhanced Cytotoxicity toward Human Colon Adenocarcinoma Cells". *Front Pharmacol.*, 2017, 8.
- Kim J.Y., Kim H.H., Cho K.H. "Acute cardiovascular toxicity of sterilizers, PHMG, and PGH: severe inflammation in human cells and heart failure in zebrafish". *Cardiovasc. Toxicol.*, 2013, 13, 148-160.
- Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin, G., Wu W., Wieckowski S., Luangsivilay J., Godefroy S., Pantarotto D., Briand J.P., Muller S., Prato M., Bianco A. "Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type". *Nature Nanotech.*, 2007, 2, 108–113.
- Kruif J.K., Ledergerber G., Garofalo C., Fasler-Kan E., Kuentz M. "On prilled Nanotubes-in-Microgel Oral Systems for protein delivery". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 101, 90-102.
- Kryuchkova M., Danilushkina A., Lvov Y., Fakhrullin R. "Evaluation of toxicity of nanoclays and graphene oxide in vivo: a *Paramecium caudatum* study". *Environm Sci Nano*, 2016, 3, 442–452.
- Lazzara G., Riela S., Fakhrullin R.F. "Clay-based drug-delivery systems: what does the future hold?". *Ther Deliv.*, 2017, 8, 633-646.
- Lee J.H., Choi G., Oh Y.J., Park J.W., Choy Y.B., Park M.C., Yoon Y.J., Lee H.J., Chang H.C., Choy J.H. "A nanohybrid system for taste masking of sildenafil". *Int. J. Nanomedicine*, 2012, 7, 1635–1649.
- Leroueil P.R., Berry S.A., Duthie K., Han G., Rotello V.M., McNerny D.Q., Baker J.R. Jr, Orr B.G., Holl M.M. "Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers". *Nano Lett.*, 2008, 8, 420–424.
- Li L., Fan H., Wang L., Jin Z. "Does halloysite behave like an inert carrier for doxorubicin?". *RSC Adv.*, 2016, 6, 54193–54201.
- Liang R., Wei M., Evans D.G., Duan X. "Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics". *Chem. Commun.*, 2014, 50, 14071-14081.
- Liu H., Wang Z., Liu S., Yao X., Chen Y., Shen S., Wu Y., Tian W. "Intracellular pathway of halloysite nanotubes: potential application for antitumor drug delivery". *J Mater Sci.*, 2019, 54, 693–704.

- Liu H.Y., Du L., Zhao Y.T., Tian W.Q. “*In Vitro* Hemocompatibility and Cytotoxicity Evaluation of Halloysite Nanotubes for Biomedical Application”. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 2015.
- Liu Y., Tan J., Thomas A., u-Yang D., Muzykantov V.R. “The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery”. *Ther Deliv.*, 2012, 3, 181–194.
- Lordan S., Kennedy J.E., Higginbotham C.L. “Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line”. *J Appl Toxicol.*, 2011, 31, 27–35.
- Lvov Y., Aerov A., Fakhrullin R. “Clay nanotube encapsulation for functional biocomposites”. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014, 207, 189–198.
- Lvov Y.M., Abdullajev E. “Functional polymer-clay nanotube composites with sustained release of chemical agents”. *Progress in polymer Science*, 2013, 38, 1690–1719.
- Lvov Y.M., Devilliers M.M., Fakhrullin R.F. “The application of halloysite tubule nanoclay in drug delivery”. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2016, 13, 977–986.
- Maisanaba S., Puerto M., Pichardo S., Jordá M., Moreno F.J., Aucejo S., Jos Á. “*In vitro* toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications”. *Food Chem Toxicol.*, 2013, 57, 266–275.
- Maisanaba S., Gutiérrez-Praena D., Pichardo S., Moreno F.J., Jordá M., Cameán A.M., Aucejo S., Jos A. “Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2”. *J Appl Toxicol.*, 2014, 34, 714–725.
- Maisanaba S., Pichardo S., Puerto M., Gutiérrez-Praena D., Cameán A.M., Jos A. “Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review”. *Environ Res.*, 2015a, 138, 233–254.
- Maisanaba S., Prieto A.I., Pichardo S., Jordá-Beneyto M., Aucejo S., Jos Á. “Cytotoxicity and mutagenicity assessment of organomodified clays potentially used in food packaging”. *Toxicol. In Vitro*, 2015b, 29, 1222–1230.
- Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P.K., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J.F., Lessard R.R., Sommer J.M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H.C., High K.A., Kay M.A. “Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response”. *Nat. Med.*, 2006, 12, 342–347.

- Marini J.C., Forlino A. "Replenishing cartilage from endogenous stem cells". *N Engl J Med.*, 2012, 366, 2522-2524.
- Massaro M., Amorati R., Cavallaro G., Guernelli S., Lazzara G., Milioto S., Noto R., Poma P., Riela S. "Direct chemical grafted curcumin on halloysite nanotubes as dual-responsive prodrug for pharmacological applications". *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2016, 140, 505–513.
- Massaro M., Barone G., Biddecì G., Cavallaro G., Di Blasi F., Lazzara G., Nicotra G., Spinella C., Spinelli G., Riela S. "Halloysite nanotubes-carbon dots hybrids multifunctional nanocarrier with positive cell target ability as a potential non-viral vector for oral gene therapy". *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019b, 552, 236–246.
- Massaro M., Buscemi G., Arista L., Biddecì G., Cavallaro G., D'Anna F., Di Blasi F., Ferrante A., Lazzara G., Rizzo C., Spinelli G., Ullrich T., Riela S. "Multifunctional carrier based on Halloysite/Laponite hybrid hydrogel for kartogenin delivery". *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019a, 10, 419-424.
- Massaro M., Cavallaro G., Colletti C.G., D'Azzo G., Guernelli S., Lazzara G., Pieraccini S., Riela S. "Halloysite nanotubes for efficient loading, stabilization and controlled release of insulin". *J Colloid Interface Sci.*, 2018a, 524, 156-164.
- Massaro M., Colletti C.G., Lazzara G., Riela S. "The Use of Some Clay Minerals as Natural Resources for Drug Carrier Applications". *J. Funct. Biomater.*, 2018b, 9, 58.
- Massaro M., Colletti C.G., Noto R., Riela S., Poma P., Guernelli S., Parisi F., Milioto S., Lazzara G. "Pharmaceutical properties of supramolecular assembly of co-loaded cardanol/triazole-halloysite systems". *International Journal of Pharmaceutics*, 2015a, 478, 476-485.
- Massaro M., Lazzara G., Milioto S., Noto R., Riela S. "Covalently modified halloysite clay nanotubes: synthesis, properties, biological and medical applications". *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5, 2867-2882.
- Massaro M., Lazzara G., Noto R., Riela S. "Halloysite nanotubes: a green resource for materials and life sciences". *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 2020a, 31, 213–221.
- Massaro M., Piana S., Colletti C.G., Noto R., Riela S., Baiamonte C., Giordano C., Pizzolanti G., Cavallaro G., Milioto S., Lazzara G. "Multicavity halloysite-amphiphilic cyclodextrin hybrids for co-delivery of natural drugs into thyroid cancer cells". *J. Mater. Chem.*, 2015b, 3, 4074-4081.
- Massaro M., Poma P., Colletti C.G., Barattucci A., Bonaccorsi P.M., Lazzara G., Nicotra G., Parisi F., Salerno T.M.G., Spinella C., Riela S. "Chemical and biological

evaluation of cross-linked halloysite-curcumin derivatives”. *Applied Clay Science*, 2020b, 184, 105400.

- Massaro M., Riela S., Lo Meo P., Noto R., Cavallaro G., Milioto S., Lazzara G. “Functionalized halloysite multivalent glycocluster as a new drug delivery system”. *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 7732-7738.
- Maudens P., Seemayer C.A., Thauvin C., Gabay C., Jordan O., Allémann E. “Nanocrystal-Polymer Particles: Extended Delivery Carriers for Osteoarthritis Treatment”, *Small*, 2018, 14, 1703108.
- Maynard A.D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdörster G., Philbert M.A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S.S., Tran L., Walker N.J., Warheit D.B. “Safe handling of nanotechnology”. *Nature*, 2006, 444, 267–269.
- Mayor S., Pagano R.E. “Pathways of clathrin-independent endocytosis”. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, 8, 603–612.
- McMahon H.T., Boucrot E. “Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis”. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, 12, 517–533.
- Mihaila S.M., Gaharwar A.K., Reis R.L., Khademhosseini A., Marques A.P., Gomes M.E. “The osteogenic differentiation of SSEA-4 sub-population of human adipose derived stem cells using silicate nanoplatelets”. *Biomaterials*, 2014, 35, 9087–9099.
- Mohammadinejad R., Dadashzadeh A., Moghassemi S., Ashrafizadeh M., Dehshahri A., Pardakhty A., Sassan H., Sohrevardi S.M., Mandegary A. “Shedding light on gene therapy: carbon dots for the minimally invasive image guided delivery of plasmids and noncoding RNAs-A review”. *J. Adv. Res.*, 2019, 18, 81-93.
- Moller P., Christophersen D.V., Jacobsen N.R., Skovmand A., Gouveia A.C., Andersen M.H., Kermanizadeh A., Jensen D.M., Danielsen P.H., Roursgaard M., Jantzen K., Loft S. “Atherosclerosis and Vasomotor Dysfunction in Arteries of Animals after Exposure to Combustion-Derived Particulate Matter or Nanomaterials”. *Critical Reviews in Toxicology*, 2016, 46, 437–476.
- Moller P., Jacobsen N.R. “Weight of Evidence Analysis for Assessing the Genotoxic Potential of Carbon Nanotubes”. *Critical Reviews in Toxicology*, 2017, 47, 867-884.
- Mousa M., Evans N.D., Oreffo R.O.C., Dawson J.I. “Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity”. *Biomaterials*, 2018, 159, 204–214.

- Nagavarma B.V.N., Yadav H.K.S, Ayaz A., Vasudha L.S., Shivakumar H.G. "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012, 5, 16-23.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. "Toxic potential of materials at the Nanolevel". *Science*, 2006, 311, 622–627.
- Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface". *Nat. Mater.*, 2009, 8, 543–557.
- Oh Y.J., Choi G., Choy Y.B., Park J.W., Park J.H., Lee H.J., Yoon Y.J., Chang H.C., Choy J.H. "Aripiprazole-montmorillonite: a new organic-inorganic nanohybrid material for biomedical applications". *Chemistry*, 2013, 19, 4869–4875.
- Onoue S., Yamada S., Chan H. "Nanodrugs: pharmacokinetics and safety". *Int J Nanomedicine*, 2014, 9, 1025-1037.
- Panariti A., Miserocchi G., Rivolta I. "The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions?". *Nanotechnology, Science and Applications*, 2012, 5, 87–100.
- Park J.H., Shin H.J., Kim M.H., Kim J.S., Kang N., Lee J.Y., Kim K.T., Lee J.I., Kim D.D. "Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug-delivery systems". *J. Pharm. Invest.*, 2016, 46, 363–375.
- Park K. "Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back". *J. Controlled Release*, 2014, 190, 3–8.
- Pasbakhsh P., Churchman G.J. "Natural Mineral nanotubes". *New York: Apple Academic Press*, 2015, pp. 95-115.
- Pasbakhsh P., Churchman G.J., Keeling J.L. "Characterisation of properties of various halloysites relevant to their use as nanotubes and microfibre fillers". *Applied Clay Science*, 2013, 74, 47–57.
- Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy". *Nat. Nanotech.*, 2007, 2, 751-760.
- Petrova V., Annicchiarico-Petruzzelli M., Melino G., Amelio I. "The hypoxic tumour microenvironment". *Oncogenesis* 2018, 7, 10.
- Pietroiusti A., Campagnolo L., Fadeel B. "Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers". *Small*, 2013, 9, 1557-1572.

- Pizzimenti S., Toaldo C., Pettazzoni P. “The ‘Two-Faced’ effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer”. *Cancers*, 2010, 2, 338–363.
- Powers K.W., Palazuelos M., Moudgil B.M., Roberts S.M. “Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies”. *Nanotoxicology*, 2007, 1, 42–51.
- Price R.R., Gaber B.P., Lvov Y.M. “*In-vitro* release characteristics of tetracycline HCl, khellin and nicotinamide adenine dinucleotide from Halloysite; a cylindrical mineral”. *J Microencapsul.*, 2001, 18, 713-22.
- Prishchenko D.A., Zenkov E.V., Mazurenko V.V., Fakhrullin R.F., Lvov Y.M., Mazurenko V.G. “Molecular dynamics of the halloysite nanotubes”. *Phys Chem Chem Phys.*, 2018, 20, 5841–5849.
- Qu R., Zhang W., Liu N., Zhang Q., Liu Y., Li X., Wei Y., Feng L. “Antioil Ag₃PO₄ Nanoparticle/Polydopamine/Al₂O₃ Sandwich Structure for Complex Wastewater Treatment: Dynamic Catalysis under Natural Light”. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2018, 6, 8019-8028.
- Ramadass K., Singh G., Lakhi K.S., Benzigar M.R., Yang J.H., Kima S., Almajida A.M., Belperio T., Vinu A. “Halloysite nanotubes: Novel and eco-friendly adsorbents for high-pressure CO₂ capture”. *Microporous and mesoporous materials*, 2019, 227, 229-236.
- Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M., Batshaw M.L. “Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer”. *Mol. Genet. Metab.*, 2003, 80, 148–158.
- Rawtani D., Pandey G., Tharmavaram M., Pathak P., Akkireddy S., Agrawala Y.K. “Development of a novel ‘nanocarrier’ system based on Halloysite Nanotubes to overcome the complexation of ciprofloxacin with iron: An *in vitro* approach”. *Appl. Clay Sci.*, 2017, 150, 293-302.
- Riela S., Massaro M., Colletti C., Bommarito A., Giordano C., Milioto S., Noto R., Poma P., Lazzara G. “Development and characterization of co-loaded curcumin/triazole-halloysite systems and evaluation of their potential anticancer activity”. *Int J Pharm.*, 2014, 475, 613–623.
- Risom L., Møller P., Loft S. “Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution”. *Mutation Research*, 2005, 592, 119–137.

- Rizvi S.A.A., Saleh A.M. “Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology”. *Saudi Pharm J.*, 2018, 26, 64-70.
- Robitzki A.A., Kurz R. (2010) “Biosensing and drug delivery at the microscale”. In: Schäfer-Korting M (ed) Drug delivery. Handbook of experimental pharmacology, vol 197. Springer, Heidelberg, pp 88–112.
- Rodrigues L.A., Figueiras A., Veiga F., de Freitas R.M., Nunes L.C., da Silva Filho E.C., da Silva Leite C.M. “The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: a review”. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 2013, 103, 642-651.
- Ruiz-Hitzky E., Aranda P., Darder M., Ritwo G. “Hybrid materials based on clays for environmental and biomedical applications”. *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 9306–9321.
- Saallah S., Lenggoro I.W. “Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications”. *KONA Powder and Particle Journal*, 2018, 35, 89–111.
- Saiz E., Zimmermann E.A., Lee J.S., Wegst U.G., Tomsia A.P. “Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering”. *Dent Mater.*, 2013, 29, 103-115.
- Santos A.C., Ferreira C., Veiga F., Ribeiro A.J., Panchal A., Lvov Y., Agarwal A. “Halloysite clay nanotubes for life sciences applications: from drug encapsulation to bioscaffold”. *Adv Colloid Interface Sci.*, 2018, 257, 58–70.
- Schliwa M. “Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks”. *J. Cell Biol.*, 1982, 92, 79-91.
- Shaik M.R., Korsapati M., Panati D. “Polymers in controlled drug delivery systems”. *Int J Pharm Sci.*, 2012, 2, 112–116.
- Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G., Wright C.J., Doak S.H. “NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials”. *Biomaterials*, 2009, 30, 3891–3914.
- Singh S., Nalwa H.S. “Nanotechnology and health safety: toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health”. *J Nanosci Nanotechnol.*, 2007, 7, 3048-3070.
- Subtil A., Dautry-Varsat A. “Microtubule depolymerization inhibits clathrin coated-pit internalization in non-adherent cell lines while interleukin 2 endocytosis is not affected”. *J. Cell Sci.*, 1997, 110, 2441–2447.

- Sun J., Yendluri R., Kai L., Guo Y., Lvov Y., Yan X. "Enzyme-immobilized clay nanotube - chitosan membranes with sustainable biocatalytic activity". *Phys. Chem.*, 2017, 19, 562–567.
- Szpilska K., Czaja K., Kudla S. "Halloysite nanotubes as polyolefin fillers". *Polymery*, 2015, 60, 359-371.
- Tan D., Yuan P., Annabi-Bergaya F., Liu D., Wang L., Liu H., He H. "Loading and *in vitro* release of ibuprofen in tubular Halloysite". *Appl. Clay Sci.*, 2014, 96, 50–55.
- Tan D., Yuan P., Liu D., Du P. "Surface Modifications of Halloysite" in *Nanosized Tubular Clay Minerals*, 2016, Chapter 8, 167-201.
- Teo Z.X., Chow W.S. "Impact, thermal, and morphological properties of poly(lactic acid)/poly(methyl methacrylate)/halloysite nanotube nanocomposites". *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2016, 55, 1474-1480.
- Tsubaki M., Yoshikawa S. "Fourier-transform infra-red study of azide binding to the Fe₃-CuB binuclear site of bovine cytochrome oxidase". *Biochem.*, 1993, 32, 174-182.
- Uthaman S., Huh K.M., Park I.K. "Tumor microenvironment-responsive nanoparticles for cancer theragnostic applications" *Biomaterials Research.*, 2018, 22, 1-11.
- Vašutova V., Bezdieka P., Lang K., Hradil D. "Mineralogy of halloysites and their intercalation with porphyrine". *Ceramics*, 2013, 57, 243-250.
- Veerabadran N.G., Price R. R., Lvov Y.M. "Clay nanotubes for encapsulation and sustained release of drugs". *Nano*, 2007, 2, 115-120.
- Vercauteren D., Vandenbroucke R.E., Jones A.T., Rejman J., Demeester J., De Smedt S.C., Sanders N.N., Braeckmans K. "The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls". *Mol Ther.*, 2010, 18, 561-569.
- Vergara D., Bellomo C., Zhang X., Vergaro V., Tinelli A., Lorusso V., Rinaldi R., Lvov Y.M., Leporatti S., Maffia M. "Lapatinib/paclitaxel polyelectrolyte nanocapsules for overcoming multidrug resistance in ovarian cancer". *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 2012, 8, 891-899.
- Vergaro V., Abdullayev E., Lvov Y.M., Zeitoun A., Cingolani R., Rinaldi R., Leporatti S. "Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes". *Biomacromolecules*, 2010, 11, 820-826.

- Vergaro V., Lvov Y.M., Leporatti S. “Halloysite clay nanotubes for resveratrol delivery to cancer cells”. *Macromol. Biosci.*, 2012, 12, 1265–1271.
- Vikulina A., Voronin D., Fakhrullin R., Vinokurov V., Volodkin D. “Naturally derived nano- and micro-drug delivery vehicles: halloysite, vaterite and nanocellulose”. *New J. Chem.*, 2020, 44, 5638–5655.
- Viseras C., Cerezo P., Sanchez R., Salcedo I., Aguzzi C. “Current challenges in clay minerals for drug delivery”. *App. Clay Sci.*, 2010, 48, 291–295.
- Wagner A., Eldawud R., White A., Agarwal S., Stueckle T.A., Sierros K.A., Rojanasakul Y., Gupta R.K., Dinu C.Z. “Toxicity evaluations of nano clays and thermally degraded by products through spectroscopical and microscopical approaches”. *Biochim Biophys Acta.*, 2017a, 1861, 3406–3415.
- Wagner A., White A.P., Stueckle T.A., Banerjee D., Sierros K.A., Rojanasakul Y., Agarwal S., Gupta R.K., Dinu C.Z. “Early assessment and correlations of nanoclay’s toxicity to their physical and chemical properties”. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017b, 20, 32323–32335.
- Walczyk D., Bombelli F.B., Monopoli M.P., Lynch I., Dawson K.A. “What the Cell ‘Sees’ in Bionanoscience”. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 5761–5768.
- Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G. “Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation”. *J. Cell Biol.*, 1993, 123, 1107–1117.
- Wang S., Li Y., Fan J., Wang Z., Zeng X., Sun Y., Song P., Ju D. “The role of autophagy in the neurotoxicity of cationic PAMAM dendrimers”. *Biomaterials*, 2014, 35, 7588–7597.
- Wang X., Gong J., Gui Z., Hu T., Xu X. “Halloysite nanotubes-induced Al accumulation and oxidative damage in liver of mice after 30-day repeated oral administration”. *Environ Toxicol.*, 2018, 33, 623–630.
- Watson H. “Biological membranes”. *Essays Biochem.*, 2015, 59, 43–69.
- Weinberg F., Ramnath N., Negrath D. “Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview”. *Cancers* 2019, 11, 1191.
- White R.D., Bavykin D.V., Walsh F.C. “The Stability of Halloysite Nanotubes in Acidic and Alkaline Aqueous Suspensions”. *Nanotechnology*, 2012, 23.

- Whitesides G. "The 'right' size in nanobiotechnology". *Nat Biotechnol*, 2003, 21, 1161–1165.
- Wilson I., Keeling J. "Global occurrence, geology and characteristics of tubular halloysite deposits". *Clay Minerals*, 2016, 51, 309-324.
- Wu S., Weng P., Tang Z., Guo B. "Sustainable Carbon Nanodots with Tunable Radical Scavenging Activity for Elastomers". *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2016, 4, 247-254.
- Wu Y.P., Yang J., Gao H.Y., Shen Y., Jiang L., Zhou C., Li Y.F., He R.R., Liu M. "Folate-Conjugated Halloysite Nanotubes, an Efficient Drug Carrier, Deliver Doxorubicin for Targeted Therapy of Breast Cancer". *ACS Appl. Nano Mater.*, 2018, 2, 595–608.
- Xia Y., Xiong Y.J., Lim B., Skrabalak SE. "Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?". *Angew. Chem. Int.*, 2009, 48, 60-103.
- Xu H.V., Zheng X.T., Zhao Y., Tan Y.N. "Uncovering the design principle of amino acid-derived photoluminescent biodots with tailor-made structure-properties and applications for cellular bioimaging". *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2018, 10, 19881–19888.
- Yah C.S., Iyuke S.E., Simate G.S., "A review of nanoparticles toxicity and their routes of exposures". *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 8, 299-314.
- Yah W.O., Takahara A., Lvov Y.M. "Selective modification of halloysite lumen with octadecylphosphonic acid: new inorganic tubular micelle". *J Am Chem Soc.*, 2012a, 134, 1853-1859.
- Yah W.O., Xu H., Soejima H., Ma W., Lvov Y., Takahara A. "Biomimetic Dopamine Derivative for Selective Polymer Modification of Halloysite Nanotube Lumen". *J. Am. Chem. Soc.*, 2012b, 134, 12134–12137.
- Yendluri R., Lvov Y., de Villiers M.M., Vinokurov V., Naumenko E., Tarasova E., Fakhrullin R. "Paclitaxel Encapsulated in Halloysite Clay Nanotubes for Intestinal and Intracellular Delivery". *J Pharm Sci.*, 2017a, 106, 3131-3139.
- Yendluri R., Otto D.P., De Villiers M.M., Vinokurov V., Lvov Y.M. "Application of halloysite clay nanotubes as a pharmaceutical excipient". *Int. J. Pharm.*, 2017b, 521, 267–273.
- Yuan P., Thill A., Bergaya F. "Nanosized Tubular Clay Minerals. Halloysite and Imogolite". *Elsevier*, 2016.

- Zhang S., Gao H., Bao G. “Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis”. *ACS Nano*, 2015, 9, 8655–8671.
- Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S. “Size-dependent endocytosis of nanoparticles”. *Adv. Mater.*, 2009, 21, 419–424.
- Zhang X.Q., Xu X., Bertrand N., Pridgen E., Swami A., Farokhzad O.C. “Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicina”. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2012, 64, 1363-1384.
- Zhang Y., Long M., Huang P., Yang H., Chang S., Hu Y., Tang A., Mao L. “Emerging integrated nanoclay-facilitated drug-delivery system for papillary thyroid cancer therapy”. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33335.

